

Aus dem Bereich der Inneren Medizin, Theoretische Medizin und
Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

Entwicklung klinisch charakterisierter HCV-Pseudotypen zur Untersuchung der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie und der Virusneutralisierung durch Antikörper

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes 2010

vorgelegt von
Dipl. Biol. Anette Drăgan
geb. am 12.07.1979 in Merzig

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Zusammenfassung (deutsch/englisch)	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Summary	2
2 Einleitung	4
2.1 Hepatitis C	4
2.2 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus	4
2.2.1 Genomorganisation	4
2.2.2 Strukturproteine	6
2.2.3 Nichtstrukturproteine	7
2.2.4 HCV-Replikationszyklus	8
2.2.5 HCV-Genotypen	8
2.3 HCV-Rezeptoren	9
2.4 Antivirale Therapie	11
2.5 Immunbiologie des HCV	12
2.6 HCV-assoziierte Kryoglobulinämie	14
2.7 HCV-Pseudotypen: ein Modellsystem zur Untersuchung der Virus-Zell Interaktion	15
2.8 Ziele der Arbeit	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Chemikalien	20
3.1.2 Kits	20
3.1.3 Restriktionsendonukleasen	20
3.1.4 DNA-Oligonucleotide	21
3.1.5 Antikörper	21
3.1.6 Geräte	21
3.2 Molekularbiologische Methoden	22

3.2.1	RNA-Präparation	22
3.2.2	Plasmid-Präparation	22
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
3.2.4	Reverse Transkription	23
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	23
3.2.6	Mutagenese-PCR	26
3.2.7	<i>Real-Time</i> PCR zur quantitativen Bestimmung von HCV-RNA	27
3.2.8	Agarosegelelektrophorese	27
3.2.9	DNA-Ppäparation aus Agarosegelen	28
3.2.10	Klonierung von PCR Produkten	29
3.2.11	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	30
3.2.12	Transformation von Bakterien	30
3.2.13	DNA-Sequenzierung	31
3.2.14	Analytische und präparative Restriktionsanalyse	32
3.2.15	Ligation	32
3.2.16	Herstellung von Histidin-markierten Fusionsproteinen	32
3.3	Arbeiten mit HCV-Pseudotypen und nativen HCV	34
3.3.1	Produktion von HCV-Pseudotypen	34
3.3.2	Infektion von Huh7-Zellen mit HCV-Pseudotypen	35
3.3.3	HCV-Neutralisationstest	36
3.3.4	Präparation nativer HCV aus Patientenseren	36
3.4	Zellbiologische Methoden	37
3.4.1	Zellkultur	37
3.4.2	Isolierung von peripheren, mononukleären Zellen aus Blutproben	38
3.4.3	Stimulierung von PBMCs	38
3.4.4	Transfektion von DNA in Eukaryonten-Zellen	39
3.4.5	Durchflusscytometrie	39
3.4.6	Färbung von B-Lymphozyten mit Fluorochrom-kon- jugierten Antikörpern	40
3.5	Proteinchemische Methoden	42
3.5.1	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie	42
3.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	43
3.5.3	Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	43
3.5.4	Western-Blot	44
3.6	Immunologische Methoden	45
3.6.1	Western-Blot Entwicklung - Immunologischer Protein- nachweis	45
3.6.2	Immunologischer Nachweis der E1/E2-Expression	45
3.6.3	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>	45

4	Ergebnisse	48
4.1	Produktion von HCV-Pseudotypen	48
4.1.1	Amplifikation der HCV-E1/E2-Gene zur Herstellung einer Konsensussequenz	48
4.1.2	Konstruktion der E1/E2-Expressionsvektoren	54
4.1.3	Rekombinante Expression von E1/E2-Proteinen	54
4.1.4	Nachweis der Infektiosität von HCV-Pseudotypen	55
4.1.5	Etablierung geeigneter Produktions- und Infektionsbe- dingungen für HCV-Pseudotypen	57
4.2	Untersuchung der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie	61
4.2.1	Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes lassen sich nicht mit HCVpp infizieren	61
4.2.2	Untersuchung der selektiven B-Zell Aktivierung durch HCV-Hüllproteine	62
4.2.3	Gewinnung von nativen Hepatitis C Viren zur Stimu- lation von PBMCs	64
4.2.4	Untersuchung der IgM Antikörperproduktion nach Sti- mulation von PBMCs	64
4.3	Pseudotypen als Modellsystem zur Untersuchung neutralisie- render Antikörper	68
4.3.1	Entstehung von HVR1-Mutationen unter antiviraler Therapie	69
4.3.2	Konstruktion der Expressionsvektoren zur Herstellung von Pseudotypen mit HVR1-Mutationen	71
4.3.3	Neutralisierung von Pseudotypen mit Therapie indu- zierten HVR1-Mutationen	72
5	Diskussion	76
5.1	HCV-Pseudotypen	76
5.1.1	Expression von E1/E2-Proteinen und funktionale HCV- Pseudotypen	77
5.1.2	Unterschiedliche HCV-Genotypen unterscheiden sich in ihrer Infektiosität	78
5.1.3	Humanes Serum steigert die Infektiosität von HCV- Pseudotypen	79
5.2	HCV-assoziierte Kryoglobulinämie	80
5.2.1	HCV-assoziierte Kryoglobulinämie und die Rolle der HVR1	81
5.2.2	Infektion von B-Lymphozyten mit HCV-Pseudotypen	82
5.2.3	E2-induzierte Aktivierung von B-Lymphozyten	83
5.2.4	E2-induzierte Sekretion von IgM Antikörpern	84

5.2.5	Kritischer Vergleich der verwendeten Modellsysteme zur Erklärung einer HCV-assoziierten Kryoglobulinämie	86
5.3	Pseudotypen als Modellsystem zur Untersuchung neutralisierender Antikörper	87
5.3.1	Entstehung von HVR1-Mutationen unter antiviraler Therapie	88
5.3.2	Virus- <i>Escape</i> und die Rolle der HVR1	88
	Literaturverzeichnis	91
	Publikationen	104
	Danksagung	106
	Anhang	107

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl2	<i>B-cell lymphoma/leukemia 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Kapsid-(<i>Core</i>)-Protein
CAP/CTM	Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy-desoxyribonucleic acid</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CLDN-Rezeptor	claudin-Rezeptor
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	dendritische Zellen
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin</i>
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
E1/E2	HCV Hüllprotein 1 und 2
ETR	<i>end of treatment relapse</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCV	Enzephalomyocarditis Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	konstante Domäne eines Antikörpers
FCS	fötale Kälberserum

Abkürzung	
FL	Fluoreszenzkanal des Cytometers
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers
FSC	<i>forward scatter</i> , Forwärtsstreulicht
FU	<i>follow up</i> (nach Therapie)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	Hepatitis C Virus <i>cell culture</i>
HCVpp	Hepatitis C Virus-Pseudotypen
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HVR1/HVR2	Hypervariable Region 1 und 2
ICAM	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferon
Ig (G/M)	Immunglobulin (G/M)
IL	Interleukin
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
L-SIGN	<i>dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin related</i>
LTRs	<i>long terminal repeats</i>
MC	gemischte Kryoglobulinämie
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MLV	Maus Leukämie Virus
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NR	<i>non responder</i>
NS-Protein	Nicht-Struktur-Protein
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTR	nicht translatierte Region
PBMC	periphere mononukleären Blutzellen
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase

Abkürzung	
SAC	Pansorbin- <i>Cells</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>cowan</i> Zellsuspension
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR-B1-Rezeptor	<i>Scavenger receptor class B, type I</i>
SSC	<i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TCR	T-Zell Rezeptor
Th	T-Helferzelle
TMB	tetramethylbenzidin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TW	Therapiewoche
Tyr	Tyrosin
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Kapitel 1

Zusammenfassung (deutsch/englisch)

1.1 Zusammenfassung

Die gemischte Kryoglobulinämie ist eine lymphoproliferative Erkrankung, die in ca. 95 % der Fälle mit einer chronischen Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion assoziiert ist. Die Evidenz für einen Zusammenhang zwischen HCV-Infektion und der Entwicklung einer Kryoglobulinämie stammt bisher aus epidemiologischen Studien und klinischen Daten, wobei der zugrundeliegende Mechanismus der Krankheitsentstehung noch größtenteils unbekannt ist.

Zur Untersuchung der HCV-assoziierten Entwicklung der Kryoglobulinämie wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals funktionale, klinisch charakterisierte HCV-Pseudotypen hergestellt. Hierbei wurden retrovirale Kapside mit HCV-E1/E2-Hüllproteinen verschiedener Genotypen pseudotypisiert, die aus Seren von HCV infizierten Patienten mit nachgewiesener Kryoglobulinämie stammen. Für alle in dieser Arbeit generierten Pseudotypen konnte nach Verbesserung der Produktions- und Infektionsbedingungen eine Infektion der Targetzellen von durchschnittlich 25 % (Genotyp 1), 40 % (Genotyp 2) und 2 % (Genotyp 3) erreicht werden. Die Zugabe von humanem Serum während der Infektionsphase konnte dabei als kritischer Schritt bei der Steigerung der Infektiösität der Partikel herausgestellt werden. Mit Hilfe des entwickelten Pseudotypensystems wurde die E1/E2-Interaktion mit primären Lymphozyten untersucht, um durch Stimulation der Zellen mit HCV-Hüllproteinen mögliche Kryoglobulinämie-induzierte Effekte zu finden. Dabei konnte erstmals ein System etabliert werden, welches in der Lage ist, die durch HCV-Pseudotypen oder native HCV-Partikel induzierte Änderung der IgM Produktion von B-Lymphozyten zu erfassen. Letztendlich konnte aber weder die Verwendung von HCV-Pseudotypen noch von nativen Viren einen eindeutigen Hinweis für einen Kryoglobulinämie-spezifischen Effekt liefern.

Des Weiteren wurde mit Hilfe von klinisch charakterisierten Pseudotypen die Virusneutralisierung durch Bindung von Antikörpern unter Berücksichtigung von selektionierten HVR1-Mutationen untersucht, die für einen möglichen Virus-*Escape* verantwortlich gemacht werden könnten. Es wurden die HCV-E1/E2-Sequenzen zweier Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten unter antiviraler Interferon-Therapie auf die Selektion von HVR1-Mutationen untersucht. Gefundene HVR1-Mutationen wurden in das HCV-Pseudotypenmodell eingebaut und zur Analyse der Virusneutralisierung durch Antikörper aus Patientenseren, welches zu verschiedenen Therapiezeitpunkte gewonnen wurde, verwendet. Es wurde gezeigt, dass in allen Seren neutralisierende Antikörper vorhanden sind, die die HCV-Pseudotypen Infektion um mindestens 50 % inhibieren. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Pseudotypen mit HVR1-Mutationen auch in Seren neutralisiert werden, welche vor Entstehung der Mutation entnommen wurden. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Viruslast und Virusneutralisierung, wobei jedoch ein Virus-*Escape* unter dem Gesichtspunkt eines dynamischen Prozesses nicht ausgeschlossen werden kann.

1.2 Summary

Mixed cryoglobulinemia, a lymphoproliferative disorder, is in approximately 95 % of all cases associated with a chronic HCV-infection. So far, evidence for HCV-associated cryoglobulinemia mainly arose from epidemiological and clinical data but the underlying mechanisms are widely unknown. According to the author's knowledge, clinically characterized HCV-pseudotypes were generated for the first time in order to investigate the development of HCV-associated cryoglobulinemia. Thereby retroviral capsids were pseudotyped with HCV-E1/E2 envelope proteins belonging to different genotypes derived from patients with cryoglobulinemia. After improvement of pseudotype production, infection could be detected in 25 % (genotype 1), 40 % (genotype 2) and 2 % (genotyp 3) of the target cells, respectively. During this work, it could be determined that the addition of human serum during the infection phase is a critical step in stimulation of HCV-pseudotype infection. The established pseudotype system allowed the investigation of HCV-E1/E2 interaction with primary lymphocytes in order to analyze cryoglobulinemia specific effects. Thereby, a system for measuring changes in IgM concentration induced by HCV-pseudotypes and native HCV particles could be established for the first time. However, the use of neither HCV-pseudotypes nor native HCV resulted in cryoglobulinemia specific effects.

Furthermore, clinically characterized HCV-pseudotypes were used to stu-

dy the autologous neutralizing antibody response with respect to selected HVR1 mutations which could be responsible for virus escape. The HCV E1/E2 sequences of two patients infected with HCV were analyzed at different times during interferone-based antiviral therapy. Pseudotypes harboring the identified mutations were successfully constructed and used to analyze autologous antibody neutralization during therapy. Neutralizing antibodies could be detected in all sera showing an inhibition of infection of at least 50 %. HCV-pseudotypes harboring HVR1 mutations were also neutralized in sera that were collected before the mutation occurred. There was no direct correlation between viral load and virus neutralization, however a virus escape can not be ruled out assuming a highly dynamic system.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Hepatitis C

Hepatitis C ist eine Entzündung der Leber, die durch eine Infektion mit HCV verursacht wird. Nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind rund drei Prozent der Weltbevölkerung mit HCV infiziert. Bei ca. 30 Prozent der Infizierten verläuft die Infektion mild und heilt nach der akuten Krankheitsphase ohne bleibende Schäden aus. Siebzig Prozent der Infektionen nehmen allerdings einen chronischen Verlauf und können langfristig zu Leberschäden, wie Leberzirrhose oder Leberkrebs, führen. Im Verlauf einer chronischen HCV-Infektion kann es neben der Leberentzündung zu extrahepatischen, meist Antikörper-vermittelten Erkrankungen kommen. Zu diesen zählt die Kryoglobulinämie, das Sjögren-Syndrom, die Panarteriitis nodosa und die Immunkomplex-Glomerulonephritis.

2.2 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus

2.2.1 Genomorganisation

Das Hepatitis C Virus wurde im Jahre 1988 identifiziert und wird seitdem in die Gattung *Hepacivirus* und die Familie *Flaviviridae* eingeordnet. Das HCV ist ein ca. 45 nm großes, einzelsträngiges RNA-Virus mit positiver Polarität ((+)ssRNA) und einer Länge von ca. 9600 Nukleotiden (Choo et al., 1989). Die virale RNA enthält einen offenen Leserahmen, der für ein ca. 3000 Aminosäuren umfassendes Polyprotein kodiert. Nach proteolytischer Spaltung durch zelluläre Peptidasen und virus-kodierte Proteasen entstehen die drei strukturbildenden Proteine Core (C), Hüllprotein E1 und E2 sowie die Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B.

(Abbildung 2.1). Der Polyproteinbereich, welcher sich zwischen E2 und NS2 befindet, wird proteolytisch zu einem 7 kDa großen Polypeptid p7 prozessiert. Vom p7 Polypeptid, das nicht vollständig vom E2-Protein abgespalten wird, ist bislang keine genaue Funktion bekannt. In künstlichen Membransystemen bildet p7 einen Ionen Kanal (Griffin et al., 2003, 2004). Kürzlich wurde ein weiteres Protein namens F-Protein beschrieben, das infolge einer ribosomalen Leserasterverschiebung im Bereich der mRNA des C-Proteins translatiert wird (Xu et al., 2001). Am amino- und carboxyterminalen Ende der HCV-RNA befinden sich jeweils ca. 341 bzw. 230 Nukleotide lange, nicht translatierte Überhänge (5' und 3' NTR). Im Bereich der hochkonservierten 5'NTR ist eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) lokalisiert, die die Expression des HCV-Polyprotein ohne zusätzliche eukaryontische Initiationsfaktoren steuert. Die 3'NTR besteht aus einem variablen Bereich, einem Poly-U/UC-Bereich und einem konservierten Bereich der eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist.

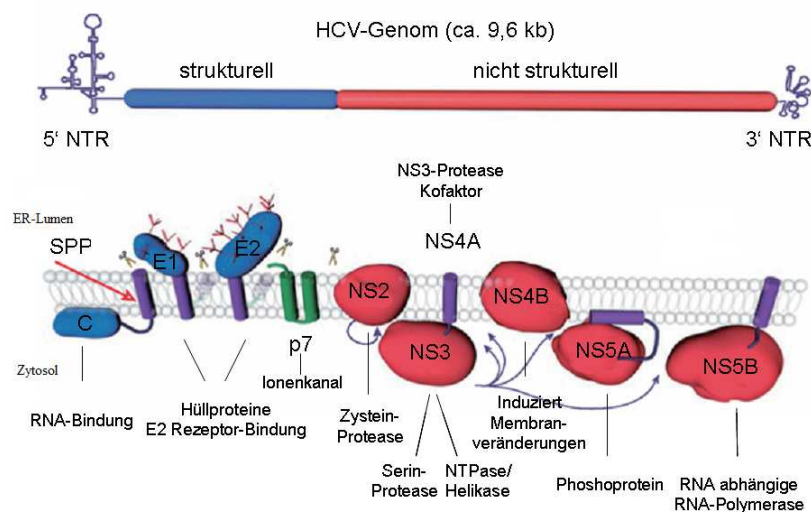


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der HCV-Genomorganisation und der Polyprotein-Prozessierung. Oben: die virale RNA enthält einen offenen Leserahmen der für ein Polyprotein, bestehend aus Struktur- und Nichtstrukturproteinen, kodiert. Die 5' NTR mit interner IRES und die 3'NTR weisen Sekundärstrukturen auf. Unten: Prozessierung des Polyproteins und Lage der 10 HCV-Proteine relativ zur ER-Membran. SSP bezeichnet die Spaltung des Core-Proteins durch eine Signal Peptid-Peptidase. Die Scheren deuten die Schnittstellen der zellulären Signal-Peptidasen an. Die Pfeile geben die Schnittstellen der Nichtstrukturproteine durch virus-kodierte Proteasen an. Die Funktion der einzelnen Proteine ist angegeben. Abbildung modifiziert nach Dubuisson (2007)

2.2.2 Strukturproteine

Die HCV-Strukturproteine werden, wie in Abschnitt 2.2.1 erwähnt, post-translational durch zelluläre Signalpeptidasen gespalten. Das Core-Protein ist ein hoch konserviertes, RNA-bindendes Protein, welches das Nukleokapsid bildet (Santolini et al., 1994; Yasui et al., 1998). Am Carboxyterminus des Core-Proteins befindet sich eine hydrophobe Region, welche als Signalsequenz für die kotranslationale Translokation des E1-Proteins durch die ER-Membran dient.

Die HCV-Glykoproteine E1 und E2 sind Typ-I-Transmembranproteine, die als Heterodimere die virale Hülle bilden (Deleersnyder et al., 1997; Dubuisson, 2000). Werden beide Proteine rekombinant exprimiert, verbleibt das Heterodimer hauptsächlich im ER (Bartosch et al., 2003b), während nur geringe Mengen zur Plasma-Membran transportiert werden (Drummer et al., 2003; Duvet et al., 1998; Rouillé et al., 2006). Das Molekulargewicht der glykosylierten Proteine beträgt nach Expression in Säugetierzellen etwa 31 kDa (E1) bzw. 70 kDa (E2). Für E1 sind sechs und für das E2-Protein elf potentielle Glykosylierungsstellen vorhergesagt, wovon die meisten hoch konserviert sind (Goffard and Dubuisson, 2003; Zhang et al., 2004b). Am Carboxyterminus beider Proteine befinden sich hydrophobe Bereiche, die für die Verankerung der Proteine in der Membran essentiell sind. Am aminoterminalen Ende des E2-Proteins befinden sich die sog. hypervariablen Regionen 1 (HVR1, aa 384 bis 410, Nummerierung erfolgt analog zum HCV-J Genom nach Kato et al. (1990)) und HVR2 (aa 474 bis 480, Nummerierung nach Kato et al. (1990)).

Die HVR1 ist der Bereich innerhalb des E2-Proteins, welcher die größte Sequenzheterogenität aufweist (Kato et al., 1992; Weiner et al., 1991) und welcher als B-Zellepitop und als Epitop für neutralisierende Antikörper identifiziert wurde (Bartosch et al., 2003b; Farci et al., 1996; Isaguliantz et al., 2002; Keck et al., 2004; Li et al., 2001; Mondelli et al., 2003; Nakamoto et al., 1996; Owsianka et al., 2005; Roccasecca et al., 2001; Scarselli et al., 1995; Schofield et al., 2005; Sekiya et al., 1994; Zibert et al., 1995). Möglicherweise könnte die HVR1 durch die Selektion von resistenten Virusvarianten bei der Chronifizierung der HCV-Infektion eine Rolle spielen (Higashi et al., 1993; Kato et al., 1994, 1993; Kurosaki et al., 1993; Ogata et al., 1991; Weiner et al., 1992). Trotz hoher Sequenzvariabilität scheinen die physikochemischen Eigenschaften sowie die Konformation der HVR1 hoch konserviert zu sein (Penin et al., 2001). Beide Hüllproteine sind essentiell für die Infektiosität des Virus und für die Interaktion mit verschiedenen zellulären Rezeptoren (siehe Abschnitt 2.3).

2.2.3 Nichtstrukturproteine

Der Bereich NS2 kodiert zusammen mit dem N-terminalen Bereich des NS3 für die Expression einer autokatalytischen, Zink-abhängigen Protease, die das Polyprotein zwischen NS2 und NS3 spaltet (Hijikata et al., 1993a). Die übrigen nichtstrukturellen Proteine werden durch die NS3/4A-Protease prozessiert.

Das NS3-Protein enthält im aminoterminalen Bereich eine Serinprotease, die an der autokatalytischen NS3/4A-Spaltung beteiligt ist. Für die Spaltung NS4A/B, NS4B/5A und NS5A/B bildet das NS3-Protein einen Komplex mit dem NS4A-Kofaktor (Bartenschlager et al., 1993; Grakoui et al., 1993; Love et al., 1996). Im carboxyterminalen Bereich des NS3-Proteins ist eine NTPase/Helikase-Domäne lokalisiert, welche eine wichtige Rolle bei der Replikation der viralen RNA spielt (Preugschat et al., 1996; Suzich et al., 1993; Tai et al., 1996).

Das NS4A-Protein ist neben seiner Rolle als wichtiger Kofaktor der NS3/4A-Protease auch an der Phosphorylierung des NS5A-Proteins beteiligt (Koch and Bartenschlager, 1999; Lin et al., 1997).

Das NS4B-Protein ist ein hydrophobes, integrales Membranprotein mit multiplen Transmembrandomänen, dass Membranveränderungen induziert und an der Bildung des Replikationskomplexes beteiligt ist (Gosert et al., 2003; Lundin et al., 2003).

NS5A ist ein stark phosphoryliertes Protein (Kaneko et al., 1994; Tanji et al., 1995), dessen genaue Funktion bislang nicht vollständig geklärt ist, dem aber eine Interferonresistenz vermittelnde Wirkung zugeschrieben wird (Hu et al., 2001; Pawlotsky, 2000; Tan and Katze, 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass NS5A ein Zink-bindendes Metalloprotein darstellt und dass die NS5A-vermittelte Zink Koordination essentiell an der HCV-RNA-Replikation beteiligt ist (Tellinghuisen et al., 2005).

Das NS5B-Protein kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP), die für die Replikation von viraler RNA notwendig ist. Da die RNA-abhängige RNA-Polymerase des HCV keine 3'→5' Exonukleaseaktivität besitzt, kommt es zu einer hohen Mutationsfrequenz des HCV-Genoms. Pro Tag werden ca. 10×10^{12} Virionen gebildet, wobei ca. ein Aminosäureaustausch pro Virus entsteht (Pawlotsky, 2003a). Die RdRP und das NS3-Protein sind aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität direkt an der Virusreplikation beteiligt und stellen daher attraktive Angriffspunkte für die Entwicklung von direkt antiviralen Wirkstoffen (Polymerase- und Protease-Inhibitoren) dar (siehe Abschnitt 2.4).

2.2.4 HCV-Replikationszyklus

Die Infektion mit HCV erfolgt vor allem über kontaminiertes Blut bzw. Blutprodukte. Die Virusreplikation findet hauptsächlich in Leberzellen statt (Blight et al., 1994). Die Bindung des Virus an die Zelloberfläche erfolgt über eine Interaktion seines Hüllproteins E2 mit zellulären Rezeptoren (siehe Abschnitt 2.3). Nach einer Clathrin-vermittelten endozytotischen Aufnahme der Virionen in die Zelle wird die Virus-RNA im Zytoplasma freigesetzt. Dort binden Ribosome an der IRES und translatieren die (+)ssRNA-Sequenz zum Polyprotein, welches durch zelluläre und virus-kodierte Proteasen (siehe Abschnitt 2.2.1 und Abbildung 2.1) zu den für die Replikation notwendigen Enzymen prozessiert wird. Es wurde gezeigt, dass die prozessierten Nichtstrukturproteine NS3 bis NS5B einen Replikationskomplex bilden, der eng mit Membranen des rauen ER assoziiert ist und innerhalb dessen die Replikation stattfindet (El-Hage and Luo, 2003; Gosert et al., 2003). Während der Genomreplikation wird das Positivstranggenom des HCV mit Hilfe der NS5B-Polymerase in ein Minusstranggenom umgeschrieben. Dieses steht wiederum als Matrize für die Synthese von genomischer RNA mit positiver Orientierung zu Verfügung. Im Verlauf der Virusreplikation werden die neu synthetisierten RNA-Stränge einerseits direkt in das virale Polyprotein translatiert und stehen andererseits für die Bildung neuer Virionen zur Verfügung (Abbildung 2.2).

Die korrekte Faltung der Hüllproteine und deren Glykosylierung erfolgt im rauen ER. Der Zusammenbau von neu synthetisierter genomischer RNA und den Strukturproteinen (Morphogenese) erfolgt an der ER-Membran. Über die Golgi-Vesikel werden die Virionen zur Plasmamembran transportiert und durch Exozytose ausgeschleust.

2.2.5 HCV-Genotypen

Da die RNA-abhängige RNA-Polymerase des HCV keine 3'→5' Exonukleaseaktivität besitzt, kommt es zu einer hohen Mutationsfrequenz des HCV-Genoms. Aufgrund von Sequenzunterschieden innerhalb des HCV-Genoms erfolgt die Klassifizierung der unterschiedlichen Varianten in mindestens 6 Genotypen (Genotyp 1 bis 6), innerhalb derer wiederum unterschiedliche Subtypen (1a, 1b...) unterschieden werden (Simmonds et al., 1993; Smith et al., 1997). Kürzlich wurde ein siebter Genotyp beschrieben (Murphy et al., 2007). Die einzelnen Genotypen unterscheiden sich in der geographischen Verteilung. In Deutschland sind die Genotypen 1b und 1a am häufigsten (ca. 70 %), gefolgt von den Genotypen 3 und 2, während in Nord- und Zentral-Afrika z. B. der Genotyp 4, in Südafrika der Genotyp 5 und in Vietnam sowie Thai-

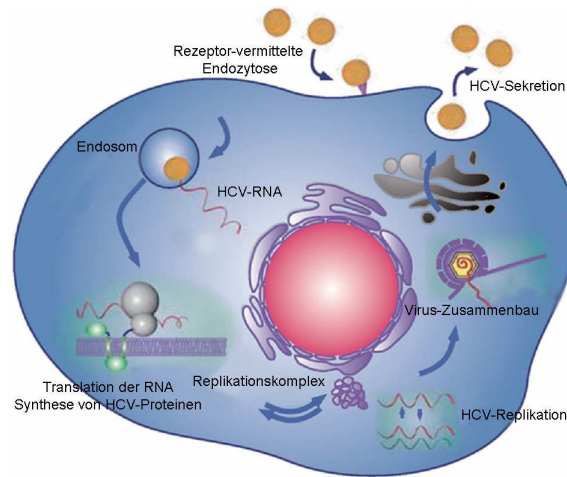


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der HCV-Infektion und Virusvermehrung. Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose verschmelzen die Viruspartikel mit Endosomen. Durch Ansäuerung des Endosoms wird die HCV-RNA freigesetzt. Die RNA wird an freien Ribosomen translatiert und HCV-Proteine werden synthetisiert. Die NS3- bis NS5B-Proteine bilden einen ER-assoziierten Replikationskomplex, der für die RNA-Replikation verantwortlich ist. Der Zusammenbau von neu synthetisierter genomischer RNA und den Strukturproteinen erfolgt an der ER-Membran. Über Golgi-Vesikel werden die Virionen zur Plasmamembran transportiert und durch Exozytose ausgeschleust. Abbildung modifiziert nach Dubuisson (2007)

land der Genotyp 6 vorherrschend sind. Die Klassifizierung in Geno- und Subtypen hat keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf, ist aber bedeutsam für die Wahrscheinlichkeit eines dauerhaften, Interferon-basierten Therapieansprechens (Berg et al., 2003) (siehe Abschnitt 2.4) .

2.3 HCV-Rezeptoren

Mit Hilfe löslicher E2-Proteine konnte CD81 als der erste HCV-relevante Zellrezeptor identifiziert werden (Pileri et al., 1998). Mittlerweile wurde seine essentielle Beteiligung an der zellulären Virusaufnahme sowohl mit HCV-Pseudotypen als auch mit einem infektiösen und replikationskompetenten HCV-Zellkultursystem (HCVcc) bestätigt (Bartosch et al., 2003b; Lindenschmidt et al., 2005; Zhang et al., 2004a). CD81 ist ein 236 Aminosäuren umfassendes Protein mit 4 Transmembrandomänen. Als E2-Bindungsstelle wurde der *large extracellular loop* (LEL) des Moleküls identifiziert (Zhang et al., 2004a). Da die Virusreplikation hauptsächlich in Hepatozyten stattfindet (Blight et al., 1994), wurde angenommen, dass die HCV-Rezeptoren leberspe-

zifisch sein müssten. Allerdings wird CD81 auch auf einer Vielzahl von extrahepatischen Zellen exprimiert, die nicht mit HCV infiziert werden. Demnach lässt sich die Existenz weiterer, möglicherweise leberspezifischer Rezeptoren nicht ausschließen.

Der SR-B1-Rezeptor wurde als Korezeptor für die HCV-Virusaufnahme beschrieben (Scarselli et al., 2002). Hierbei handelt es sich um ein Glykoprotein, das vor allem in der Leber vorkommt. SR-B1 ist ein Lipoproteinrezeptor, der HDL bindet und ihm Cholesterinester entzieht (reverser Cholesterintransport). Da HDL mit Hilfe von HCV-Pseudotypen als infektiösersteigernde Komponente des humanen Serums identifiziert wurde (Bartosch et al., 2005), wird vermutet, dass der Lipid-Anteil der Zellmembran mit der Virusaufnahme in Zusammenhang stehen könnte (Rigotti et al., 2003).

Der Claudin1-Rezeptor wurde kürzlich ebenfalls als Korezeptor für HCV beschrieben. Claudin1 ist ein *tight junction*-Molekül, dass vielfach in der Leber vorkommt. *Tight junctions* werden von Membranproteinen gebildet und stellen Zellkontakte zwischen Epithelzellen her, welche den Molekültransport durch das Epithel kontrollieren. Außerdem dienen sie der mechanischen Stabilisierung des Epithelverbandes. Durch Expression von Claudin1 auf 293T-Zellen, welche trotz CD81- und SR-B1-Expression nicht mit HCV infizierbar waren, konnte eine Infektion mit HCV-Pseudotypen induziert werden (Evans et al., 2007). Daraufhin wurden auch weitere Claudin-Rezeptoren (Claudin6 und Claudin9) als HCV-Korezeptoren identifiziert (Zheng et al., 2007).

Occludin gehört ebenfalls zu den *tight junction*-Molekülen und ist zur Zeit der jüngste, für HCV identifizierte Rezeptor (Ploss et al., 2009). Occludin ist ein Polypeptid bestehend aus 4 Transmembrandomänen wovon 2 extrazelluläre Schleifen an der Bildung von Zellkontakten beteiligt sind. Neben CD81, SR-B1 und den Claudin-Rezeptoren stellt Occludin einen weiteren, essentiellen HCV-Rezeptor dar, durch dessen Expression Tierzellen durch HCV infizierbar werden. Damit besteht die Möglichkeit, ein Kleintiermodell zur Untersuchung von HCV zu entwickeln, was bisher aufgrund der beschränkten Wirtsspezifität für Menschen und Schimpansen nicht möglich war.

Für die Typ C-Lektin Rezeptoren L-SIGN und DC-SIGN wurde ebenfalls eine Bindung von löslichen E2-Proteinen und aus Plasma isolierten Viren gezeigt (Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2004, 2003; Pöhlmann et al., 2003). Da allerdings keiner dieser Rezeptoren auf Hepatozyten exprimiert wird, sind sie wahrscheinlich nur indirekt an der Virus Aufnahme in die Zelle beteiligt. Es wird vermutet, dass sie zirkulierende Viren binden und als sog. *Capture*-Moleküle fungieren. Weiterhin wurden als indirekte, am viralen Zelleintritt beteiligte Faktoren der LDL-Rezeptor (Agnello et al., 1999), Glykoaminoglykane (Germi et al., 2002) und die Lipoprotein-Lipase (Andréo et al., 2007) identifiziert. Durch die Assoziation der Viren mit Lipoproteinen wird die In-

teraktion des HCV mit den oben genannten Molekülen erleichtert.

2.4 Antivirale Therapie

Die Standardbehandlung einer HCV-Infektion besteht derzeit aus einer kombinierten Therapie mit pegyliertem Interferon α (Peginterferon α -2a bzw. Peginterferon α -2b) und dem Nukleosidanalogon Ribavirin über eine Dauer von 16 bis 48, selten 72 Wochen (Zeuzem et al., 2004a,b). Hierbei kommt es in 54 % bis 56 % der Fälle zum Ausheilen der Infektion, wobei das Therapieansprechen von den unterschiedlichen HCV-Genotypen erheblich beeinflusst wird. Die Heilungsraten bei einer Infektion mit dem in Deutschland am häufigsten vorkommenden HCV-Genotyp 1 liegen bei nur 42 % bis 52 % (Pawlotsky, 2003b), wohingegen die Heilungschancen bei einer Infektion mit den HCV-Genotypen 2 und 3 bei 78 % bis 86 % liegen (Mangia et al., 2005). Neben dem zugrundeliegenden Genotyp spielen auch weitere Faktoren wie z.B. Alter, Gewicht, Geschlecht, Herkunft und HCV-RNA Konzentration zu Therapiebeginn eine Rolle für die Wirksamkeit der Therapie (Berg et al., 2003; Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004; Jeffers et al., 2004; Manns et al., 2001). Bei fehlendem Ansprechen auf die Interferon/Ribavirin basierte Therapie oder bei Patienten, die trotz kurzzeitiger Viruseliminierung unter Therapie rückfällig werden, werden eine Vielzahl von möglichen viralen Resistenzmechanismen, welche mit den viralen Proteinen Core, E2, NS3/4A und NS5A in Zusammenhang gebracht werden, diskutiert (Wohnsland et al., 2007). Kürzlich wurden auch Wirts-assoziierte Faktoren in Korrelation mit dem Therapieansprechen beschrieben (Suppiah et al., 2009).

Außerdem werden bei derzeitiger Therapie oft erhebliche Nebenwirkungen beschrieben, sodass die Entwicklung von alternativen Therapieformen dringend notwendig ist. Hierzu zählen direkt antiviral wirkenden Substanzen wie z.B. Protease- oder Polymerase-Inhibitoren, die direkt die Virusvermehrung inhibieren. Zur Zeit liegen Ergebnisse von klinischen Phase I- und II-Studien von Protease-Inhibitoren wie z. B. Telaprevir und Boceprevir, sowie von Polymerase-Inhibitoren wie z. B. Valopicitabine, R1626 und HCV796 vor, wobei deren Wirksamkeit durch eine rasche Selektion resistenter Virusvarianten limitiert ist (Hézode et al., 2009; Kieffer et al., 2007; Lin et al., 2005, 2004; McHutchison et al., 2009; Migliaccio et al., 2003; Olsen et al., 2004; Reiser et al., 2005; Sarrazin et al., 2007a,b; Sarrazin and Zeuzem, 2010; Susser et al., 2009; Tong et al., 2006; Welsch et al., 2008).

2.5 Immunbiologie des HCV

Die Immunantwort infolge einer HCV-Infektion ist sowohl humoraler als auch zellulärer Art. Nach einer akuten HCV-Infektion tritt zunächst eine unspezifische Immunreaktion ein, die von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), neutrophilen Granulocyten und Makrophagen unterstützt wird. Parallel kommt es durch die Präsentation von HCV-Antigenfragmenten über *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II Molekülen auf der Oberfläche von dendritischen Zellen (DC) zur Aktivierung einer spezifischen Immunreaktion von CD4-positiven T-Lymphozyten (T-Helferzellen, Th). Diese Zellen verfügen durch die Sekretion verschiedener Zytokine über immunregulatorische Funktionen. Durch die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ) werden CD8-positive cytotoxische Killerzellen (CTL) aktiviert. Man spricht auch von einer Th-1 Immunantwort. Die Sekretion von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10) stimuliert hingegen die Proliferation und Antikörperproduktion von B-Lymphozyten, was als Th-2 Immunantwort bezeichnet wird (Abbildung 2.3).

Für den Verlauf und die Pathogenese der HCV-Infektion spielt insbesondere die virusspezifische T-Zellantwort eine entscheidende Rolle. Bei Patienten mit einer akuten, selbstlimitierenden HCV-Infektion wird eine starke, multispezifische CD4- und CD8-positive T-Zellantwort beobachtet (Cooper et al., 1999; Grüner et al., 2000; Lechner et al., 2000; Thimme et al., 2002, 2001), während bei einer chronischen HCV-Infektion eine schwächere T-Zellantwort als bei einer selbstlimitierenden Infektion beobachtet wird (Cox et al., 2005a; Ulsenheimer et al., 2003; Wedemeyer et al., 2002). Des Weiteren konnten Mutationen innerhalb des CD8-positiven T-Zellepitops mit der Entstehung einer chronischen Infektion korreliert werden (Cox et al., 2005b; Erickson et al., 2001; Gerlach et al., 1999; Tester et al., 2005; Timm et al., 2004). Bei einer HCV Erstinfektion ist die Wahrscheinlichkeit einer Viruseliminierung bei Patienten mit einer Th1-Zytokinsekretion (IL-2, IFN- γ) größer als bei Patienten mit einer Th2-Zytokinsekretion (IL-4, IL-5, IL-10,) (Cramp et al., 1999; Diepolder et al., 1995; Takaki et al., 2000; Tsai et al., 1997; Woitas et al., 1997). Für eine nachhaltige Eliminierung des HCV scheint auch die Dauer der T-Zellantwort entscheidend zu sein. So wurde bei Patienten, die nach einer initialen, starken CD4-positiven T-Zellantwort das Virus eliminierten, bei Verlust der spezifischen T-Zellantwort ein Wiederauftreten der Infektion beobachtet (Gerlach et al., 1999).

Virusspezifische Antikörper sind gewöhnlich 7 bis 8 Wochen nach Infektion detektierbar (Pawlotsky, 1999), wobei ihre Bedeutung für die Viruseliminierung bislang noch unzureichend verstanden ist. Im Schimpansenmodell konnte eine Infektion einerseits durch die Behandlung mit neutralisieren-

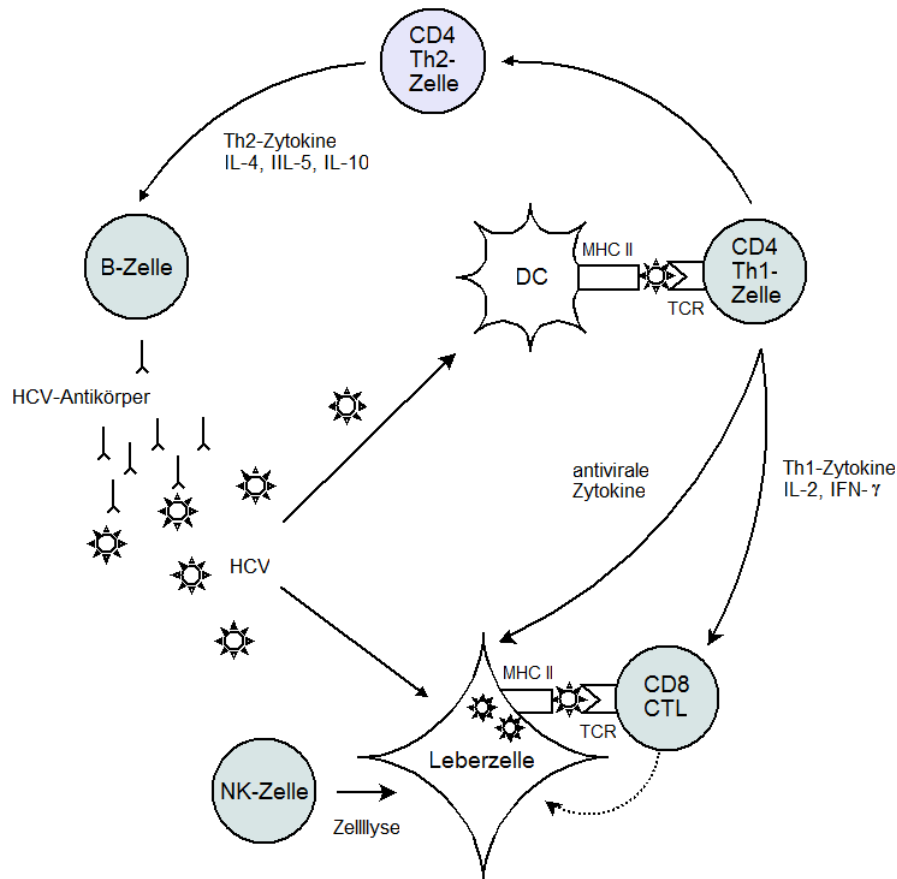


Abbildung 2.3: Komponenten der HCV Immunantwort. Die Präsentation von HCV-Antigenen auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen (DC) führt zur Aktivierung von CD4-positiven T-Lymphozyten. Durch Zytokinsekretion werden CD8-positive cytotoxische Killerzellen und B-Lymphozyten (B-Zelle) aktiviert, welche infizierte Zellen lysieren und HCV-spezifische Antikörper produzieren. T-Helferzellen 1 und 2 (Th1, Th2), Interferon (IFN), Interleukin (IL), cytotoxische Killerzellen (CTL), natürliche Killerzellen (NK), T-Zellrezeptor (TCR), Major Histocompatibility Complex (MHC). Abbildung modifiziert nach Liang et al. (2000)

den Antikörper verhindert werden (Farci et al., 1996), während andererseits gegen HCV erworbene Antikörper keinen Schutz gegen eine erneute Infektion bei Schimpansen oder Menschen bieten (Farci et al., 1992; Lai et al., 1994). Außerdem kann eine Infektion bei Schimpansen und Menschen ohne die Entstehung von Antikörpern gegen HCV geheilt werden (Cooper et al., 1999; Post et al., 2004). Die HVR1 innerhalb des E2-Proteins, welche als B-Zellepitop identifiziert wurde (Isagulians et al., 2002; Nakamoto et al., 1996; Scarselli et al., 1995; Sekiya et al., 1994), scheint eine wichtige Rolle bei der

Virusneutralisierung zu spielen (Bartosch et al., 2003b; Farci et al., 1996; Keck et al., 2004; Li et al., 2001; Mondelli et al., 2003; Owsianka et al., 2005; Roccasecca et al., 2001; Schofield et al., 2005; Zibert et al., 1995). Mutationen innerhalb dieser Region führen möglicherweise dazu, dass die HVR1-Epitope nicht mehr erkannt werden, was als ein Grund für die Entstehung der chronischen HCV-Infektion diskutiert wird (Higashi et al., 1993; Kato et al., 1994, 1993; Kurosaki et al., 1993; Ogata et al., 1991; Weiner et al., 1992).

2.6 HCV-assoziierte Kryoglobulinämie

Das Kryoglobulinämiesyndrom ist eine Form der Gefässentzündung, die in der Mehrzahl der Fälle mit einer chronischen HCV-Infektion assoziiert ist (Cacoub et al., 1994; Dammacco et al., 1993; Ferri et al., 1991; Pascual et al., 1990). Kryoglobuline sind Immunglobuline, die bei Temperaturen unter 37 °C präzipitieren und sich in den Gefäßwänden ablagern, was zu massiven Entzündungen führen kann. Neben Gelenkschmerzen können weitere Symptome wie z.B. Muskelschmerzen, Nierenentzündungen, Neuropathien, Lymphknotenerkrankungen und eine Purpura auftreten. In den Kryopräzipitaten lassen sich sowohl HCV-RNA als auch HCV-spezifische Antikörper nachweisen. Aufgrund ihrer immunchemischen Zusammensetzung unterscheidet man drei verschiedene Typen von Kryoglobulinämien (Brouet et al., 1974):

1. Typ 1 Kryoglobuline: Monoklonale Kryoglobuline, monoklonales Immunglobulin G (IgG) oder Immunglobulin M (IgM).
2. Typ 2 Kryoglobuline: Gemischte Kryoglobuline, meist monoklonales IgM, das ähnlich wie Rheumafaktoren an die konstante Region (Fc) eines IgG bindet.
3. Typ 3 Kryoglobuline: Gemischte Kryoglobuline, polyklonales IgM, das mit einem anderen polyklonalen Immunglobulin-Komplexe bildet.

Im Falle der chronischen HCV-Infektion wird eine gemischte Kryoglobulinämie (MC, Typ 2) beobachtet. Die Entstehung der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie tritt mit geographisch unterschiedlicher Häufigkeit auf. So ist die Prävalenz der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie beispielsweise in Südeuropa höher als in Nordeuropa oder Nordamerika. Einhergehend mit der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie wird auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms beschrieben (Zuckerman et al., 1997).

Eine Hypothese, die die Entwicklung der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie zu erklären versucht, setzt eine direkte Bindung des E2-Proteins an

den CD81-Rezeptor von B-Lymphozyten voraus (Pileri et al., 1998). Dieser Rezeptor bildet auf B-Lymphozyten einen Komplex mit CD19 und CD21, was die Zellen gegenüber einer Stimulierung sensibilisiert (Fearon and Carter, 1995). Auf T-Lymphozyten führt die Bindung des HCV-E2-Proteins an den CD81-Rezeptor zu einer Herabsetzung der Aktivierungsschwelle dieser Zellen und zu deren Proliferation mit Zytokinsekretion (Wack et al., 2001). Möglicherweise resultiert eine E2-CD81-Bindung auf B-Lymphozyten, in ähnlicher Weise wie für T-Lymphozyten gezeigt, in einer Zellaktivierung und Proliferation mit Sekretion von Kryoglobulinen. Des Weiteren konnte bei HCV-Patienten mit assoziierter Kryoglobulinämie eine erhöhte Expression des CD81-Rezeptors auf B-Lymphozyten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Kryoglobulinämie gezeigt werden (Hofmann et al., 2004), was eine mögliche Beteiligung des CD81-Rezeptors bei der Entstehung der Kryoglobulinämie unterstützt.

Neben der indirekten CD81-vermittelten Aktivierung der B-Lymphozyten durch das E2-Protein wird auch eine direkte Infektion der Lymphozyten mit HCV, als Entstehungsgrund der Kryoglobulinämie diskutiert. Sansonno et al. (1998) konnten zeigen, dass die durch HCV infizierten B-Lymphozyten der Leber Rheumafaktoren sezernieren, was zu einer persistenten Stimulierung der Zellen und Sekretion von Kryoglobulinen führen könnte.

Ein weiterer Mechanismus der die Entstehung einer HCV-assoziierten Kryoglobulinämie erklären könnte, beruht auf der Beobachtung einer häufig vorkommenden Translokation t(14;18) in dem anti-apoptotisch wirkenden *B-cell lymphoma/leukemia 2*-Gen (*Bcl2*) bei Patienten mit Kryoglobulinämie (Zignego et al., 1997, 1992). Die Überexpression dieses Onkogens führt zu einem verlängerten Überleben und der Expansion von B-Lymphozyten. Die gleiche Translokation t(14;18) ist gleichzeitig die häufigste genetischen Aberration, die in humanen Lymphomen gefunden wird (Korsmeyer, 1992). Die Aktivierung des *Bcl2*-Onkogens könnte ein früher Schritt in der HCV abhängigen Entwicklung einer Kryoglobulinämie und der Entstehung eines B-Zell-Lymphoms darstellen. In Abbildung 2.4 sind mögliche Faktoren skizziert, die zur Entstehung der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie und anderen lymphoproliferativen Erkrankungen beitragen könnten.

2.7 HCV-Pseudotypen: ein Modellsystem zur Untersuchung der Virus-Zell Interaktion

HCV-Pseudotypen sind rekombinante Viruspartikel bestehend aus retroviralen Kapsiden kombiniert mit HCV-Hüllproteinen. Retroviren stellen beson-

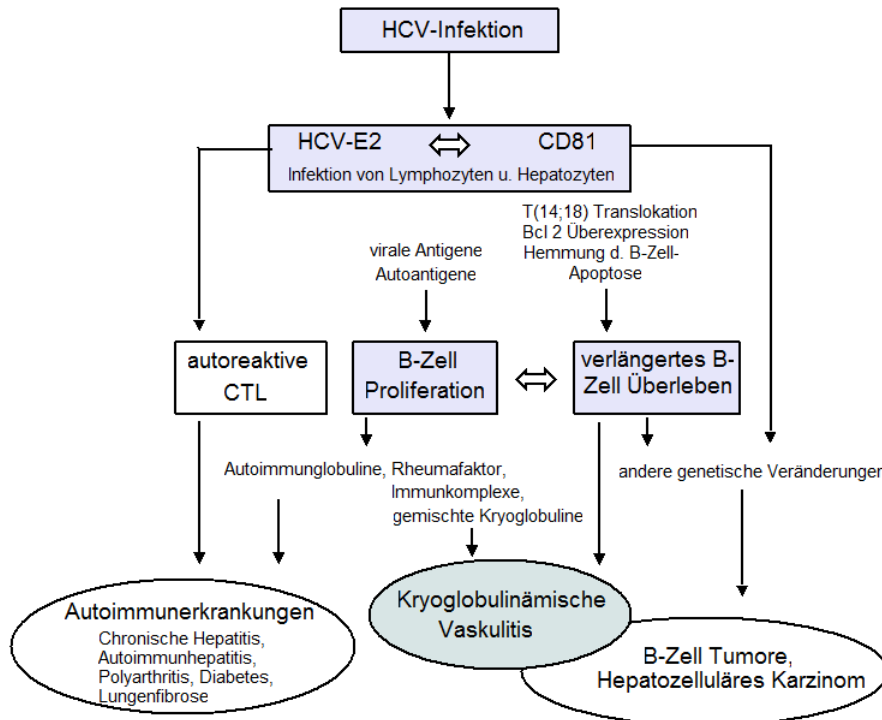


Abbildung 2.4: Mögliche Pathogenese der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie. Die HCV-Infektion führt zu einer chronischen Stimulierung des Immunsystems. Hierbei könnte die HCV- E2-Interaktion mit dem CD81-Rezeptor ein wichtiger Schritt in der Kaskade der Immunreaktionen darstellen. Die Translokation t(14;18) wird häufig in Patienten mit HCV-assoziiierter Kryoglobulinämie gefunden. Die Aktivierung des Onkogens *Bcl2* könnte zu einer verlängerten Überlebensdauer der B-Lymphozyten beitragen. Durch virale Antigene wird die B-Zell Proliferation stimuliert, was für die Produktion von diversen Autoimmunglobulinen, einschließlich Rheumafaktor und Kryoglobulinen, führt. *B-cell lymphoma/leukemia 2*-Gen (*Bcl2*), cytotoxische T-Lymphozyten (CTL). Abbildung modifiziert nach Ferri et al. (2002)

ders gut geeignete Vektoren für den Gentransfer in eukaryotischen Zellen dar. Das Genom replikationskompetenter Retroviren besteht aus zwei identischen, einzelsträngigen RNA-Molekülen. Nach Replikation dieser Viren entsteht ein doppelsträngiges DNA-Intermediat, Provirus genannt, das sich stabil in das Genom der Wirtszelle integriert. Die Grundbausteine aller Retroviren werden von den Genen *gag* (Kapsidproteine), *pol* (reverse Transkriptase und Integrase) und *env* (Hüllproteine) kodiert. Die retroviralen Vektoren leiteten sich ursprünglich von dem relativ einfach gebauten Maus-Leukämie Virus (MLV) ab. In den vergangenen Jahren entstanden aus gentherapeutische Ansätzen

eine Reihe replikationsinkompetenter, lentiviraler Vektoren (Berkowitz et al., 2001; Demaison et al., 2002; Mselli-Lakhal et al., 1998; Naldini et al., 1996; Poeschla, 2003; Poeschla et al., 1998). Vorteil des lentiviralen Vektors gegenüber dem onkoretroviralen Vektor ist seine Fähigkeit auch ausdifferenzierte Zellen zu transfizieren, da das lentivirale Genom einen sog. Präintegrationskomplex kodiert, der die intakte Kernmembran passieren kann (Fouchier and Malim, 1999; Naldini et al., 1996). Im Gegensatz zu den in der Gentherapie eingesetzten Gentransfer-Retroviren besitzen die HCV pseudotypisierten retroviralen Vektoren anstelle eines Transgens die genetische Information des grün fluoreszierenden Proteins (*GFP*) als Reportergen. Somit kann die Interaktion von HCV-Pseudotypen und Zielzellen anhand des in das Genom integrierten GFP-Reportergens untersucht werden.

Zur Herstellung von Pseudotypen wird eine Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Transfervektor, einem *gag/pol*-kodierenden Verpackungsvektor und dem *env*-kodierenden Expressionsvektor transfiziert (Abbildung 2.5). Aus biologischen Sicherheitsgründen beinhalten die retroviralen Vektoren keine zur Bildung von replikationskompetenten Viren notwendigen Informationen sondern lediglich die Information für das GFP-Reportergen und die retroviralen 5' und 3' *long terminal repeats* (LTRs). Die LTRs sind für reverse Transkription und Provirus-Integration (hier Reportergen) in das Genom der infizierten Wirtszelle notwendig. Das Vorhandensein der retroviralen ψ -Sequenz im retroviralen Vektor gewährleistet die Verpackung der Reportergen-RNA in die HCV-Pseudotypen während der Biosynthese in den Produktionszellen.

Der *gag/pol*-kodierende Verpackungsvektor beinhaltet ein deletiertes Verpackungssignal ($\Delta\psi$) damit die von ihm transkribierte RNA nicht in die Partikel verpackt werden kann. *Gag* kodiert die MLV-Kapsid-Proteine und ist für das Ausschleusen der Pseudotypen aus der Zelle und die Erkennung des ψ -Verpackungssignals zuständig, während *pol* für die MLV-Polymerase (RT), RNaseH und Integrase kodiert. Die Verteilung der zur Pseudotypenproduktion benötigten genetischen Informationen auf drei verschiedene Vektoren minimiert zudem die Gefahr von Rekombinationsereignissen während der Zellproliferation. In Abbildung 2.5 ist die Produktion der Pseudotypen schematisch dargestellt.

Die erfolgreiche Produktion von infektiösen HCV-Pseudotypen wurde erstmals von Bartosch et al. (2003a) beschrieben. Da retro- und lentivirale Kapsidproteine zur Zelloberfläche transportiert werden, stellte sich die Frage, wie die in der ER-Membran verankerten HCV-Hüllproteine in die Kapside eingebaut werden. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass während einer HCV-E1/E2-Überexpression die Hüllproteine durch endosomale Kompartimente zur Zelloberfläche transportiert werden (Bartosch et al.,

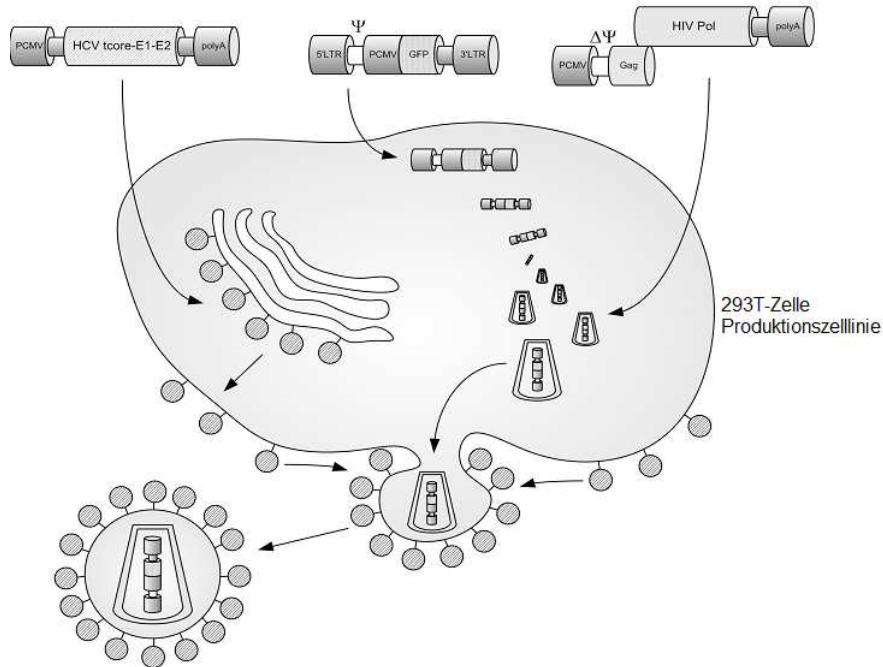


Abbildung 2.5: HCV-Pseudotypen Produktion in 293T-Zellen. Die entscheidenden genetischen Elemente, die zur Produktion der Pseudotypen benötigt werden sind angegeben. Die vom Transfervektor abgelesene RNA wird zusammen mit der vom Verpackungsvektor kodierten reversen Polymerase in die viralen Kapside verpackt. Durch Inkorporation der HCV-E1/E2-Proteine in die Zellmembran entstehen infektiöse HCV-Pseudotypen.

2003b; Drummer et al., 2003; Hsu et al., 2003). Parallel dazu wurde gezeigt, dass retro- und lentivirale Kapside auch in intrazellulären, endosomalen Kompartimenten zusammengebaut werden (Sherer et al., 2003). Mittlerweile wurde die Produktion funktionaler HCV-Pseudotypen von mehreren Gruppen bestätigt (Bartosch et al., 2003b; Drummer et al., 2003; Hsu et al., 2003; Sandrin et al., 2005).

2.8 Ziele der Arbeit

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Herstellung von klinisch charakterisierten Pseudotypen. Klinisch charakterisiert bedeutet, dass die zur Pseudotypisierung verwendeten Hüllproteinsequenzen aus Patientenseren gewonnen wurden, deren Virus-Infektion und Krankheitsgeschichten nach verschiedensten Parametern analysiert wurde und bei denen zum Teil eine Kryoglobulinämie nachgewiesen wurde. Mit Hilfe dieser Pseudotypen sollten zum

Einen, die Entstehung der HCV-assoziiierter Kryoglobulinämie, und zum Anderen, die Virusneutralisierung durch Antikörper aus Patientenseren, untersucht werden. Zur Etablierung funktionaler HCV-Pseudotypen waren folgende Schritte erforderlich

1. Herstellung von E1/E2-Konsensussequenzen aus klinisch charakterisierten Patientenseren
2. Funktionalitätsnachweis der produzierten Pseudotypen
3. Etablierung und Optimierung der Produktion von Pseudotypen

Mit Hilfe des entwickelten Pseudotypensystems sollte die E1/E2-Interaktion mit primären Lymphozyten imitieren werden, um mögliche Kryoglobulinämie-induzierte Effekte zu finden. Hierbei sollte speziell eine mögliche Kryoglobulinämie-abhängige, verstärkte B-Zell Aktivität als Folge der Virusinteraktion untersucht werden. Da sich die Kryoglobulinämie durch eine vermehrte IgM Antikörperproduktion auszeichnet, sollte die IgM Konzentration nach Stimulation von PBMCs gesunder Probanden als Parameter zur Untersuchung Kryoglobulinämie-bedingter Effekte benutzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte mit Hilfe von klinisch charakterisierten Pseudotypen die Virusneutralisierung durch Bindung von Antikörpern unter Berücksichtigung von Veränderungen im Bereich der HVR1 untersucht werden. Es wird vermutet, dass Mutationen innerhalb der HVR1 zur Modulation des B-Zellepitops führen, die das Virus vor einer Neutralisierung durch Antikörper schützt, was zu einem sog. *Virus-Escape* führt. Zur Klärung dieser Hypothese sollten Pseudotypen mit HVR1 Mutationen, die bei Patienten im Laufe der antiviralen Interferontherapie gefunden wurden, produziert werden. Unter Verwendung von Huh7 als Zielzellen sollte ein möglicher HVR1-bedingter *Virus-Escape* als Hemmung der Infektion der Pseudotypen durch die Bindung von neutralisierenden Antikörpern gemessen werden.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Häufig verwendete Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Applied Biosystems (ABI) (Weiterstadt), PeqLab (Erlangen), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (St. Louis), Stratagene (Amsterdam), Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Braun (Melsungen), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe).

3.1.2 Kits

Handelsname	Hersteller
BigDye [®] Terminator Cycle Kit 1.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
CalPhos [™] Mammalian Transfection Kit	BD Biosciences, Heidelberg
DyeEx [®] 2.0. Spin Kit	Qiagen, Hilden
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
NucleoBond [®] Xtra Maxipräparations-Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren
QIAamp [®] Viral RNA Mini Spin Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Extaction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange [®] Multiple Site-Directed	Stratagene, Amsterdam
TOPO [®] XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3 Restriktionsendonukleasen

Folgende Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt/M) verwendet: BamHI, BclI, EcoRI, EcoRV, NsiI, PstI, SalI, XhoI

3.1.4 DNA-Oligonucleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Köln) bezogen und sind im Methodenteil in folgenden Tabellen aufgeführt: Tabelle 3.1, Tabelle 3.2, Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 .

3.1.5 Antikörper

Spezies	Name	Spezifität	Konjugat	Hersteller
Maus	Anti-Histidin	monoklonal	–	Qiagen
Ziege	anti-Maus	monoklonal	HRP	BioRad
Maus	anti-human CD19	monoklonal	APC	Invitrogen
Maus	anti-human CD69	monoklonal	PE	Invitrogen
Maus	anti-human CD71	monoklonal	PE	Invitrogen
Maus	anti-human CD86	monoklonal	PE	Invitrogen
Maus	anti-CD81 MG81	monoklonal	–	S. Abrignani, Italien
Maus	anti-CD81 N81	monoklonal	–	S. Abrignani, Italien
Ziege	anti-human IgM	monoklonal	–	Bethyl Laboratories
Ziege	anti-human IgM	monoklonal	HRP	Bethyl Laboratories
Ziege	anti-human IgG	monoklonal	PE	Dianova

3.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelapparaturen	Gibco BRL, Karlsruhe
Analysenwaagen	Sartorius, R 160P-D1, Göttingen
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank, CO ₂ -begast	Heraeus Instruments, Hanau
Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan 48 [®] Analyzer	Roche Diagnostics, Mannheim
Elektrophorese-Sequenzierautomat, 3100	Applied Biosystems, Weiterstadt
Elektrophorese-Transformator, ST 606	Gibco BRL, Karlsruhe
Facs Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Kühlzentrifuge Micro 22 R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S	DuPont, Dreieich
Mikrotiterplatten Photometer, Sunrise	Tecan, Mannedorf/Zürich
pH-Meßgerät	Knick Calimatic 761, Essen
Schüttler, Vortex REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
Spektralphotometer DU 800	Beckman Coulter, Krefeld
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau
Thermocycler 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, 5415c/5402	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge, L8 60M	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Präparation

Zur Gewinnung von HCV-RNA aus Patientenseren, wurde der *QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit* der Firma Qiagen, nach Angaben der Hersteller, verwendet. Nach Blutentnahme wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 3000 rpm) oder bei 4 °C gelagert. Das Serum wurde entfernt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert, um den Abbau der RNA durch RNAsen zu verhindern. Das Prinzip der RNA-Präparation beruht auf der selektiven Bindung der RNA an eine Silicagel-Membran. Um RNAsen zu inaktivieren und die Isolierung intakter RNA zu gewährleisten, wird die Probe zunächst unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Die Probe wird durch die Pufferbehandlung auf die richtigen Bindungsbedingungen eingestellt und auf die Silicagelsäule aufgetragen. Die RNA bindet selektiv an die Silicagel-Membran und übrige nicht bindende Substanzen des Lysats werden verworfen. Nach Elution der RNA kann diese direkt weiterverwendet werden oder bei -20 °C gelagert werden.

3.2.2 Plasmid-Präparation

Die in Bakterien vermehrten Plasmide wurden je nach benötigter DNA konzentration mit einem *QIAprep[®] Spin Minipräparations-Kit* oder einem *Nucleo-Bond[®] Xtra Maxipräparations-Kit* der Firmen Qiagen und Macherey und Nagel isoliert. Dazu wurden einzelne Transformanten mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte in ampicillin- oder kanamycinhaltiges LB-Medium überführt, in welchem sie über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) kultiviert wurden. Für eine Plasmid-Minipräparation wurden 5 mL Übernachtskulturen verwendet, während eine Maxipräparation mit 350 mL Bakterienkultur durchgeführt wurde. Die Übernachtskultur wurde 10 Minuten lang mit 5000 g bei 4 °C zentrifugiert. Die daraus resultierenden Sedimente wurden entsprechend den Angaben der Hersteller einer alkalischen Lyse unterzogen. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Anionen-Austausch Prinzip mittels spezieller Säulen, deren Silicatmatrix die DNA der Bakterien bindet. Die Elution erfolgte mit Hochsalzpuffern. Die Plasmid-DNA wurde durch eine Isopropanol-Präzipitation mit anschließender Ethanolfällung isoliert und entsalzt. Die DNA-Konzentrationen einer Minipräparation liegen durchschnittlich bei 0,2 µg µL⁻¹. Mit einer Plasmid-Maxi-Präparation können bis zu 2,5 µg µL⁻¹ DNA isoliert werden.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen erfolgte in einem Spektralphotometer durch Messung der Absorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm in Quarzküvetten. Die A_{260} gibt die Konzentration der Nukleinsäuren an. Hierbei gilt:

$$\text{für DNA: } c = 50 \times A_{260} \quad [\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}] \quad (3.1)$$

$$\text{für RNA: } c = 40 \times A_{260} \quad [\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}] \quad (3.2)$$

$$\text{für Oligonukleotide: } c = 20 \times A_{260} \quad [\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}] \quad (3.3)$$

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Lösung wird der Quotient der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm berechnet. Reine Nukleinsäuren zeichnen sich durch ein Verhältnis von etwa $260/280 = 1,8$ aus.

3.2.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient zum Nachweis von RNA, indem mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transcriptase, RT), vorhandene RNA in cDNA umgeschrieben wird. Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsmaterial in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (siehe Abschnitt 3.2.5) verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser cDNA zu amplifizieren. Zur Synthese von cDNA aus HCV-RNA, wurden 400 - 800 ng der Ausgangs-RNA in 5 μL RNase-freiem ddH₂O resuspendiert, mit 2 μL Random Hexameren (Invitrogen) gemischt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Während dieses Schrittes erfolgt die Auflösung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA und die zufällige Bindung der zugesetzten Oligonukleotid-Primer. In einem zweiten Schritt wurde, nach Zugabe des folgenden Reaktionsgemisches, innerhalb einer Stunde und einer Temperatur von 42 °C, die gewünschte cDNA synthetisiert:

Reaktionsgemisch zur Synthese von cDNA	μL
10 x PCR-Puffer (ABI + MgCl ₂)	2,5
MgCl ₂ , 25 mM (ABI)	4
dNTPs, 2 mM (Invitrogen)	4
RNaseOUT, 20 U μL^{-1} (Invitrogen)	1
ddH ₂ O	7,5
Reverser Transkriptase, 65 U μL^{-1} (Superscript II, Invitrogen)	1
cDNA	5

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine sehr sensitive und spezifische Technik zur *in vitro* Amplifikation einer DNA-Zielsequenz.

Mit Hilfe synthetischer Oligonukleotid-Primer, die zu den Enden der DNA-Zielsequenz komplementär sind und mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase, die an die Zielsequenz bindet und den Einbau von Desoxyribonucleotiden (dNTPs) katalysiert, wird ausgehend von der entsprechenden DNA-Matrize die Ziel-DNA in mehreren Zyklen vervielfältigt. Ein Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion besteht aus den drei folgenden Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzung auf 95 °C. Dabei wird die DNA in ihre zwei komplementäre Einzelstränge gespalten.
2. Annealing (Hybridisierung) der ca. 15-40 bp langen Primer an die DNA-Einzelstränge. Die Primer müssen spezifisch und komplementär zur Zielsequenz gewählt sein. Die Temperatur des Hybridisierungsschrittes ist abhängig von der Basensequenz und Länge der Primer.
3. Extension/Synthese des komplementären DNA-Doppelstrangs. Die Primer dienen als Ansatzpunkte der DNA-Polymerase für den Synthesestart. Die hitzestabile DNA-Polymerase verlängert in 3'-Richtung bei ihrem Temperaturoptimum in Anwesenheit von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten und zweiwertigem Magnesium die hybridisierten Primer. Die synthetisierte Doppelstrang-DNA dient ihrerseits in weiteren PCR-Zyklen als Matrize zur DNA-Amplifikation, sodass die Menge der Zielsequenz exponentiell vermehrt wird.

Das Anreichern identischer Kopien ermöglicht die Visualisierung des interessierenden DNA-Abschnitts durch Agarosegel-Elektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.8) und Fluoreszenzmarkierung mit Ethidiumbromid.

Zur Amplifikation der HCV-Hüllproteine E1 und E2 wurde eine Variation der PCR, eine sog. *semi-nested* PCR durchgeführt. Hierbei wurden zwei hintereinander geschaltete PCRs mit teilweise ineinander geschachtelten (*semi-nested*) Primerpaaren kombiniert, um die Sensitivität der PCR zu steigern und die absolute Kopienzahl des Amplifikates zu erhöhen. Bei dieser Form der PCR wird in einer ersten PCR mit einem Primerpaar eine Zielsequenz amplifiziert, welche als Matrize in einer zweiten PCR verwendet wird. In dieser zweiten PCR bleibt der 5'-Primer unverändert, während der 3'-Primer stromaufwärts eingerückt wird. Das Primerpaar der zweiten PCR liefert nur dann ein positives Ergebnis, wenn in der ersten PCR die korrekte Sequenz amplifiziert wurde. Die jeweiligen Primer zur Amplifikation der E1/E2-Gene sind genotypspezifisch. Sie sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Die Komponenten der ersten und zweiten PCR (PCR1 und PCR2) wurden wie folgt angesetzt. Die cDNA, welche als Matrize in der PCR1 verwendet wird, wurde wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, in einer RT-PCR generiert.

PCR1-Komponenten	μL
dNTPs, 10 mM (Invitrogen)	5
<i>Erster</i> 3'-Primer, 10 pmol μL^{-1}	1,5
5'-Primer, 10 pmol μL^{-1}	1,5
10 x Expand PCR Puffer 3 (Roche)	5
MgCl ₂ , 25 mM (ABI)	1,5
DMSO (ABI)	1
ddH ₂ O	27,5
Expand enzyme mix 3,5 U μL^{-1} (Roche)	1
cDNA aus RT-PCR	6
PCR2-Komponenten	μL
dNTPs, 10 mM (Invitrogen)	5
<i>Zweiter</i> 3'-Primer, 10 pmol μL^{-1}	1,5
5'-Primer, 10 pmol μL^{-1}	1,5
10 x Expand PCR Puffer 3 (Roche)	5
MgCl ₂ , 25 mM (ABI)	1,5
DMSO (ABI)	1
ddH ₂ O	28,5
Expand enzyme mix 3,5 μL^{-1} (Roche)	1
cDNA aus PCR1	5
Thermoprogramm	
95 °C	2 min
95 °C	10 s
50 °C	30 s
68 °C	2,5 min
68 °C	10 min

} 35×

Tabelle 3.1: Primer zur Amplifikation der HCV-E1/E2-Sequenzen

Genotyp	Position	PCR	Name	Sequenz
1	3'	1	Core35-131-1s	5'-cgtaacaccaaccgccc
	3'	2	HCV1aEcoRI-for	5'-ggaattccgacctcatgggtacataccgc
	5'	1 und 2	22057EcoRV-Stop-r	5'-ggatatcttactcgccttgggatatgagttgcatcatc
2	3'	1	HCV2a390F	5'-tcgccacaagacgttaagtttc
	3'	2	HCV2a728EcoRIInF	5'-gaattccttcgccgacctcatgggtacatc
	5'	1 und 2	HCV2a2592EcoRI	5'-ggaattcgatatcattcgccctggccaacaagatg
3	3'	1	HCV3a381F	5'-caccatccgtcgccacaggacg
	3'	2	HCV3a727EcoRIInF	5'-ggaattccttcgccgatctcatgggtacatc
	5'	1 und 2	HCV3aEcoRIXhoIR	5'-ggaattctcgagttattctgcttgatgatcgtcagg

3.2.6 Mutagenese-PCR

Die Durchführung der ortsgerichteten Mutagenese erfolgte mit Hilfe des *Quick-Change® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Hierbei wurde nach den Angaben der Hersteller verfahren. Mit dieser Technik wurden die HCV-Konsensussequenzen generiert.

Die Konsensussequenzen wurden auf der Grundlage von jeweils 5 Klonen pro Transformation berechnet. Die Sequenz, die der theoretischen Konsensussequenz am ähnlichsten war, wurde als Matritze zur Mutagenese verwendet (siehe Anhang). Für jede einzubauende Mutation wurden Mutagenese Primer entworfen, die simultan an einen der denaturierten Plasmid-Einzelstränge binden und mit Hilfe der Turbo-Pfu Polymerase zu einem komplementären Doppelstrang synthetisiert werden. Die verwendeten Mutagenese-Primer sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Für die Primer wurde eine *Annealing*-Temperatur von 55 °C und eine *Annealing*-Dauer von 7,5 Minuten gewählt. Mit dieser Technik wurden bis zu 5 Mutationen pro Plasmid simultan in einer PCR eingebaut. Die Position und Art der eingebauten Mutationen sind ausführlich im Anhang beschrieben. Anschließend wurde nicht mutierte *Template*-DNA, die durch Vermehrung in *E. coli*-Bakterien durch eine dam-Methylierung gekennzeichnet ist, mit einem DpnI-Verdau ($10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) selektiv abgebaut. Die mutierte Plasmid-DNA wurde nach Anleitung des Herstellers in ultrakompetente Bakterien (*XL 10 Gold cells*) transformiert. Das Ergebnis der Mutagenese-PCR wurde durch Sequenzierung der Plasmide, die aus Ampicillin-resistenten Klonen präpariert wurde, bestätigt.

Tabelle 3.2: Mutageneseprimer zur Herstellung der Konsensussequenzen

Genotyp	Name	Sequenz
1	22057-M1	5'-cttcgacgtcacatcgatctgcttgctcggg
	22057-M2	5'-accaggccaccgttgggcaattggtt
	22057-M3	5'-tgcacctggatgaactcatcggatttac
	22057-M4	5'-ggtcctgggtcacgccaggtgtctagtcc
2	21693-M1	5'-tgttttactcccgcctgttgctgtgggc
3	21949-M1	5'-acgtctggcctctacgtccttaccacgactgttcc
	21949-M2	5'-tccgctgttggacccagtgacacctacagtggc
	21949-M3	5'-accgctcaatacgcagtcattgtggacctattagtagg
	21949-M4	5'-gacataatagccggggccattggggcatcatggcg
	21949-M5	5'-aaggtgaggatgtttgtgggtgggttgagcaccggttgacga
	21952-M1	5'-gtcattctgcacagcctggctgttaccttgtgtcc
	21952-M2	5'-tcgccggtgggtcgtaggcactactgatgctaaggcgc
	21952-M3	5'-tcagatgttttctgctggagtcctccggcctcccag
	21952-M4	5'-aactccacggggtttgtcaagacgtgcggagctggg
	21952-M5	5'-tatggggatgggaggaaacctccaaatgagttagacc

3.2.7 *Real-Time* PCR zur quantitativen Bestimmung von HCV-RNA

Die *Real-Time* PCR wurde mit Hilfe des *Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 48[®] Analyzer* (CAP/CTM, Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers, durchgeführt. Der CAP/CTM HCV-Test ist ein *in vitro* Nukleinsäure Amplifikationstest zur quantitativen Bestimmung der HCV-RNA in Humanserum oder -plasma. Die Probenvorbereitung erfolgt automatisch mit dem *COBAS AmpliPrep* Gerät. Die Amplifikation und Detektion, beruhend auf der *Real-Time* PCR-Technologie, wird mit dem *COBAS TaqMan 48 Analyzer* ausgeführt. Der Test beruht im Wesentlichen auf 3 Schritten:

1. Probenvorbereitung zur Isolierung der HCV-RNA.
2. Reverse Transkription der Ziel-RNA zur Generierung komplementärer cDNA.
3. Simultane PCR-Amplifikation von Ziel-cDNA und Detektion der distinkt markierten Hybridisierungs sonden.

Die automatische Aufreinigung der HCV-RNA erfolgt mit Hilfe der *Magnetic Bead*-Technologie. Durch Zugabe eines chaotropen Lysepuffers und Proteinase K zur Probe werden Nukleinsäuren freigesetzt und Proteine abgebaut. Anschließend werden die Nukleinsäuren an magnetische Silikapartikel gebunden und bei erhöhter Temperatur eluiert. Die eluierte Nukleinsäure wird dann in den *COBAS TaqMan 48 Analyzer* überführt. Reverse Transkription der RNA und Amplifikation der Ziel-DNA erfolgen unter Verwendung der Z05-DNA-Polymerase, die sowohl reverse Transkriptase- als auch Polymerase-Aktivität besitzt. Die Nukleotidsequenz der Primer, die zur 5'NTR des HCV-Genoms komplementär sind, wurden so optimiert, dass eine vergleichbare Amplifikation aller HCV-Genotypen erzielt wird. Die Echtzeit-Detektion der akkumulierenden PCR-Produkte beruht auf der Grundlage des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) unter Verwendung von distinkt markierten Sonden, die mit der HCV-cDNA hybridisieren. Der CAP/CTM HCV-RNA-Test hat eine Nachweisgrenze von ca. $7,4 \text{ U mL}^{-1}$ und einen linearen Bereich der HCV-Quantifizierung von ca. 28 U mL^{-1} bis $1,4 \times 10^7 \text{ U mL}^{-1}$ (Sarrazin et al., 2008) .

3.2.8 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Agarose-Gelelektrophorese wird zur Überprüfung von Restriktions-verdaus, PCR-Reaktionen und zur Abschätzung von DNA-Konzentrationen

eingesetzt. Bei der Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Molekülen bildet Agarose je nach Konzentration im verwendeten Puffer eine Matrix aus grob- oder engmaschigen Poren, durch die DNA-Moleküle im elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Phosphorsäuregruppen im Rückgrat der DNA verleihen ihr im verwendeten TBE-Puffer bei pH 8,0 eine negative Ladung, wodurch sie zur Anode wandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional dem Logarithmus der Größe des DNA-Fragments. Die Agarose wurde in 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ vermischt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA und ermöglicht die Visualisierung der DNA-Banden in UV-Licht. Das Gel wurde in eine Flachbettgelapparatur gegossen. Durch den Einsatz eines speziellen Kammes wurden Probetaschen in benötigter Anzahl und Größe ausgespart. Die Proben wurden in einer 10-fachen Verdünnung mit Gel-Ladepuffer versetzt und in die Probetaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung wurden DNA-Größenstandards mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 60-80 V durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht und die Dokumentation mittels einer Videokamera.

10 x TBE-Puffer	
Tris-HCl	8 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL
Gel-Ladepuffer	
Bromphenolblau	2,5 mg
Xylencyanol	2,5 mg
Glycerol	300 μL
ddH ₂ O	ad 1 mL

3.2.9 DNA-Ppäparation aus Agarosegelen

Die Wiedergewinnung der DNA nach der Amplifikation oder dem Restriktionsenzymverdau erfolgte mittels dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen), nach Angaben der Hersteller. Die für weitere Anwendungen erforderliche DNA wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Die Gelstücke wurden in geeignetem Puffer und einer Temperatur von 50 °C geschmolzen. Die DNA bindet anschließend unter salzhaltigen Pufferbedingungen selektiv an eine Silicagelsäule. Nach 2 Waschschritten wurde die DNA mit destilliertem Wasser in einem Volumen von 30 μL eluiert.

3.2.10 Klonierung von PCR Produkten

Unter Klonierung von DNA versteht man ihre Vervielfältigung in identischen Kopien (Klone). Das klassische Klonierungsverfahren nutzt die Fähigkeit von Bakterien, Plasmide aufzunehmen und zu vermehren.

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten zu Sequenzierzwecken erfolgte mittels des *Topo[®]-TA-Cloning-Kits* in den Vektor pCR-XL-TOPO (Invitrogen). Der linearisierte pCR-XL-TOPO-Vektor ist an den 3'-Enden durch einen Thymidin-Überhang gekennzeichnet, der eine effektive Insertion von Taq-amplifizierten Fragmenten gewährleistet, da die Taq-Polymerase interne Transferaseaktivität besitzt, die zusätzlich ein Adenin an die 3'-Enden des PCR-Produktes anhängt. Alle PCR-Produkte, die mit anderen Polymerasen amplifiziert wurden, mussten daher nachträglich mit 1 μ L dATP und 1 μ L Taq-Polymerase 20 Minuten bei 72 °C inkubiert werden, um mit einem 3'-Adenin-Überhang versehen zu werden. Des Weiteren besitzt der Vektor eine kovalent gebundene Topoisomerase I, die die Ligation von Vektor und Insert katalysiert (Abbildung 3.1).

Das Enzym bindet an doppelsträngige DNA und spaltet die Phosphodiesterbrücken am 5'-Ende eines DNA-Strangs. Die hierbei freiwerdende Energie wird zum Aufbau einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen DNA-Strangs und einem Tyrosin-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I genutzt. Diese kovalente Phospho-Tyrosin-Bindung zwischen Vektor und Topoisomerase I wird in einem nächsten Schritt von der 5'-Hydroxy-Gruppe des amplifizierten DNA-Fragments angegriffen, wobei es zu einer Umkehrung der Reaktion und damit zur Freisetzung der Topoisomerase

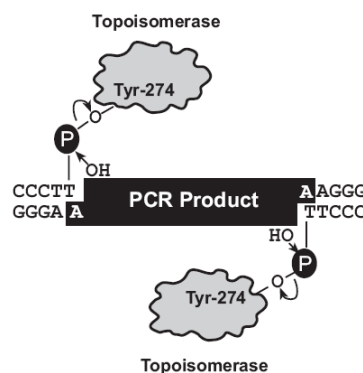


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Katalyse der Ligation von PCR-Produkt und Vektor mit Hilfe des Enzyms Topoisomerase I. (Bildquelle: Bedienungsanleitung des *Topo[®]-TA-Cloning-Kits*)

I kommt. Die Durchführung der Ligationsreaktion und der Bakterientransformation (*one shot Top 10*, Invitrogen) erfolgte gemäß den Anleitungen des Herstellers. Eine Selektion von transformierten Bakterien wurde durch eine Antibiotika-Resistenz ermöglicht, da der pCR-XL-Topo-Vektor mit einem Ampicillin-Resistenzgen ausgestattet ist.

3.2.11 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien erfolgte in einem Volumen von 400 mL LB-Medium, welches mit 1 mL einer frischen Bakterienübernachtskultur im Erlenmeyerkolben angeimpft wurde. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien für 20 Minuten auf Eis gekühlt, zentrifugiert (10 min, 2000 rpm), in 30 mL eiskaltem TFB1-Puffer aufgenommen und für 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien wie zuvor zentrifugiert, in 4 mL eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert, in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

TFB1	
Natriumazetat	30 mM, pH 5,8
NaCl	0,1 M
MgCl ₂	50 mM
CaCl ₂	10 mM
Glyzerin	15 %
TFB2	
MOPS-Puffer	10 mM, pH 7,0
CaCl ₂	75 mM
NaCl	10 mM
Glyzerin	15 %

3.2.12 Transformation von Bakterien

Eine Transformation von kompetenten Bakterien wird hauptsächlich zur Vermehrung neu konstruierter Plasmide angewandt. Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien wurden entsprechende Aliquots auf Eis aufgetaut. Fünfzig µL kompetente Zellen wurden mit 10 µL eines Ligationsansatzes oder mit 0,5 µg Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42 °C wurden die Zellen mit 0,5 mL LB-Medium versetzt und für 45 Minuten bei 37 °C in einem Thermoschüttler inkubiert. Schließlich wurde ein Teil des Transformationsansatzes, gewöhnlich 50 bis 200 µL auf LB-Agarplatten

ausplattiert, die, je nach Resistenzgen des Plasmidtyps Ampicillin oder Kanamycin zur Selektion enthalten. Es folgte eine Bebrütung der Agarplatten bei 37 °C für etwa 12-16 Stunden.

3.2.13 DNA-Sequenzierung

Mittels Sequenzierung lassen sich unter anderem Klonierungsergebnisse überprüfen und Mutationen aufdecken. Die zugrundeliegende Methode der DNA-Sequenzierung beruht auf dem von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren (Sanger, 1981). Dabei führen zum PCR-Ansatz beigefügte 2', 3'-fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotid-Triphosphate (ddNTPs), die am 3'C-Atom statt einer OH-Gruppe ein Wasserstoffatom gebunden haben zur Termination der DNA Synthese, da die Bildung einer Phosphodiesterbindung am 3'C-Atom verhindert wird. Dies hat zur Folge, dass unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen, welche ihrer Größe nach aufgetrennt werden und durch Laserlicht anregbar sind, wobei sie Licht in vier verschiedenen Spektralfarben, entsprechend den vier fluoreszenzmarkierten Nukleotiden emittieren. Für die Sequenzierung wurde der *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierprimer sind HCV Genotyp 1-, 2- und 3-spezifisch und liegen innerhalb der HCV-E1/E2 kodierenden Sequenz (Tabelle 3.3).

Alle Markierungsreaktionen wurden nach folgendem Thermoprogramm durchgeführt: Denaturierung bei 96 °C für 10 Sekunden, Annealing bei 45 °C für 15 Sekunden und Extension bei 60 °C für 4 Minuten. Die Schritte wurden 35 mal wiederholt. Anschließend wurden die überschüssigen Nukleotide durch Aufreinigung mittels des *DyeEx[®]-Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entfernt. Nach der Zugabe des jeweiligen Eluats in ein 96-*well*-

Tabelle 3.3: Genotyp-spezifische HCV-E1/E2-Sequenzierprimer

Genotyp	Position	Name	Sequenz
1	3'	E1-257-2s	5'-gcaacagggaatctgccggttgc
	3'	HVR1-Inner sense	5'-gcttgggatatgatgatgaactggtc
	5'	E2-1b-6a	5'-cgccgcattgtggaccac
2	3'	HCV2a1213F2	5'-accactggtttgtgcaagac
	3'	HCV2a1791F3	5'-tgagaccgtattgctggcac
	3'	HCV2a2271F4	5'-tcacggctgcgtgcaatttc
	5'	HCV2a1329R1	5'-gtacgccaggatcatggttag
3	3'	HCV3a1231F6	5'-catcggacgggtccagacctg
	3'	HCV3a1791F7	5'-accgtactgctggcactatg
	5'	HCV3a1331R5	5'-gatgtgtgccaccaccatac

Sequenziergefäß wurde die automatische Sequenzierung mit dem Sequenziergerät *ABI PRISMTM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) gestartet.

3.2.14 Analytische und präparative Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen sind spezielle, aus Bakterien isolierte Enzyme, die doppelsträngige DNA sequenzspezifisch schneiden. Ihre *in vivo* Funktion besteht darin, Fremd-DNA, die in Bakterien eingedrungen ist, aufgrund des DNA-Methylierungsmusters zu erkennen und abzubauen. Für den analytischen Restriktionsverdau wurden in der Regel 200 ng DNA mit 5 U der entsprechenden Enzyme unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer für maximal 2 Stunden bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 30 µL inkubiert. Zu präparativen Zwecken wurden 1 µg DNA mit den entsprechenden Enzymen und Reaktionspuffern für mindestens 2 Stunden inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend im Agarosegel (siehe Abschnitt 3.2.8) elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.15 Ligation

Für die Ligation eines DNA-Fragmentes mit einem linearisierten Vektor wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese Ligase katalysiert mit Hilfe von ATP und Mg²⁺-Ionen die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen. Bei der Ligation eines Vektors (200 ng) mit der einzubauenden DNA wurde ein molares Verhältnis von 3:1 eingestellt. Ein Standard-Ligationsansatz unter Verwendung der T4-DNA-Ligase setzt sich folgendermaßen zusammen:

Reaktionsansatz	
Ligase-Puffer, 2x (NEB)	1 µL
T4-DNA-Ligase (NEB)	1 µL
DNA-Fragment	X µL
Vektor	Y µL
ddH ₂ O	ad 10 µL

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei 16 °C. Um die Religationsrate des Vektors zu verringern, wurde dieser nach dem Restriktionsverdau mit 1 µL Phosphatase (CIP) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.2.16 Herstellung von Histidin-markierten Fusionsproteinen

Zur Sekretion von rekombinantem E2-Protein in Säugerzellen wurden Expressionsvektoren konstruiert, die mit der E1/E2-Konsensussequenz und mit

zusätzlichen Kodons zur Expression einer Histidin-Markierung, ausgestattet sind. Damit das E2-Protein nach posttranslationaler Abspaltung des E1-Proteins als lösliches Protein sekretiert wird, wurden die C-terminalen 85 Aminosäuren des E2-Proteins, die die Transmembrandomäne bilden, entfernt. Um eine einfache Gewinnung und Detektion der sekretierten Proteine zu gewährleisten, wurde der verkürzte C-Terminus des E2-Proteins mit einem Hexa-Histidin-Marker versehen. Für die Amplifikation der E1/E2-Sequenzen wurden folgende Plasmide p289/85, p289/22057, p289/21693, p289/11632, p289/21952 und p289/21949 als Matrize verwendet. Die *semi-nested* PCR wurde wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Der 3'-Primer und der 5'-Primer der PCR2 führen die für die Klonierung notwendigen Schnittstellen EcoRI und NsiI ein. Des Weiteren kodiert der 5'-Primer der PCR2 für das Hexa-Histidin-Peptid.

Anschließend wurden die Sequenzen über die Schnittstellen EcoRI und NsiI in den Expressionsvektor pCMV5 (freundlicherweise von Dr. Ricardo Biondi, Medizinische Klinik 1, Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt) kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Die Expressionsvektoren wurden analog der zugrunde liegenden Serumnummer, woraus die Konsensussequenz für die Hüllproteine amplifiziert wurde, als s85, s22057, s11632, s21693, s21949 und s21952 benannt. Nach Transfektion von 293T-Zellen wurde der Zellüberstand gesammelt und die Proteine wurden mittels Metall-Affinitätschromatographie isoliert (siehe Abschnitt 3.5.1). Zur Kontrolle wurde der Überstand von nicht transfizierten Zellen parallel zu den transfizierten

Tabelle 3.4: Primer zur Herstellung von Histidin-markierten Fusionsproteinen

Gt ^a	Position	PCR	Name	Sequenz
1	3'	1 und 2	sE2ForEcoR1gt1,2,3	5'-ccatgaattccgacctcatggggtac
	5'	1	I-AS-sE2rev-85kon ^b	5'-gtgtgaacctctgggctgagctctgatctatccctgtcctcc
	5'	1	I-AS-sE2rev-22057kon ^b	5'-gtgtgaacctctcgggctgagctcggacctgtccctgtcgtcc
	5'	2	O-AS-linker-his-NsiI	5'-ggacatgcatttaatggtgatggtgatggtgtgaacctct
2	3'	1 und 2	sE2ForEcoR1gt1,2,3	5'-ccatgaattccgacctcatggggtac
	5'	1	I-AS-sE2rev-11632kon ^b	5'-gtgtgaacctctggactctgctgacctctatctctgtcctcc
	5'	1	I-AS-sE2rev-21693kon ^b	5'-gtgtgaacctctcggagtctgctgacctgtccctgtcttcc
	5'	2	O-AS-linker-his-NsiI	5'-ggacatgcatttaatggtgatggtgatggtgtgaacctct
3	3'	1 und 2	sE2ForEcoR1gt1,2,3	5'-ccatgaattccgacctcatggggtac
	5'	1	I-AS-sE2rev-21949kon ^b	5'-gtgtgaacctctaggctgttgttcgctgcggtcacgatcctcg
	5'	1	I-AS-sE2rev-21952kon ^b	5'-gtgtgaacctctcggatgttgctcgctgcggtcacgatcctcg
	5'	2	O-AS-linker-his-NsiI	5'-ggacatgcatttaatggtgatggtgatggtgtgaacctct

a: Genotyp

b: konsensussequenz-spezifischer Primer

Zellüberständen analysiert.

3.3 Arbeiten mit HCV-Pseudotypen und nativen HCV

3.3.1 Produktion von HCV-Pseudotypen

Für die Herstellung der HCV-Pseudotypen (HCVpp) ist eine Kotransfektion der Produktionszelllinie (293T-Zelllinie) mit einem Retrovektor, mit einem Verpackungsvektor und mit einem HCV-E1/E2-Expressionsvektor notwendig. Retrovektoren und Verpackungsvektoren wurden freundlicherweise von Prof. D. von Laer (Georg-Speyer Haus, Frankfurt am Main) und von Prof. F.L. Cosset (École normale supérieure, Lyon) zur Verfügung gestellt.

Retrovirale Vektoren, Transfervektoren: in dieser Arbeit wurde zur Produktion von HCVpp der onkoretrovirale Vektor M38 verwendet, der auf dem MLV-System beruht. Dieser Vektor kodiert nicht für retrovirale Proteine, sondern enthält lediglich als retrovirale Elemente das Verpackungssignal ψ , die Primer-Bindungsstelle für den tRNA-Primer und die retroviralen 5' und 3' *long terminal repeats* (LTRs). Des Weiteren kodiert er für das zu übertragende Reportergen *gfp*, das zwischen den 5'- und 3' LTRs eingebaut ist. Das ψ -Verpackungssignal ist für die Verpackung der in der Produktionszelle synthetisierten RNA in die Pseudotypen notwendig. Die LTRs sind für den Start der reversen Transkription von RNA in provirale DNA und die Integration des Provirus (hier *gfp*) ins Genom der infizierten Wirtszelle verantwortlich.

Verpackungsvektoren: der verwendete Verpackungsvektor M2 kodiert für die viralen Gene *gag* und *pol* des MLV, die für die Verpackung der Retrovektoren verantwortlich sind. *Gag* kodiert für die MLV-Kapsid-Proteine und ist für das Ausschleusen der Pseudotypen aus der Zelle und die Erkennung des ψ -Verpackungssignals zuständig, während *pol* für die MLV-Polymerase (RT), RNaseH und Integrase kodiert. Zur Infektion von ausdifferenzierten Zellen wurden analog zu den oben geschilderten Vektoren, HIV (*human immunodeficiency virus*)-basierte Vektoren (M420 und M334) zur Herstellung von Pseudotypen verwendet.

HCV-E1/E2-Expressionvektoren: die E1/E2-Expressionsvektoren (Tabelle 4.5) wurden wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, auf der Grundlage von klinisch charakterisierten HCV-Patientenseren hergestellt.

Die Pseudotypen wurden in 293T-Zellen, der sog. Verpackungszelllinie produziert. Hierzu wurden konfluente Zellen (ca. 60 %) ca. 24 Stunden vor Transfektion in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Kulturschale (Durchmesser 100 x 20 mm) in DMEM-Medium ausgesät. Die Transfektion wur-

de mit der Kalziumphosphat-Kopräzipitationstechnik, mit Hilfe des *CalPhos Mammalian Transfektionskit* der Firma Clontech durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wurde in einem 2 mL Reaktionsgefäß angesetzt:

Reaktionsansatz	μL
ddH ₂ O	374
Retrovektor M38 (konz. 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	8
Verpackungsvektor M2 (konz. 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	8
HCV-E1/E2-Expressionsvektor (konz. 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	4

Anschließend wurden 55 μL CaCl₂ tropfenweise unter Vortexen zum Reaktionsansatz pipettiert.

In separate 2 mL-Reaktionsgefäße wurden entsprechend der Anzahl der Transfektionen jeweils 280 μL Hepes-Puffer vorgelegt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit den verschiedenen Vektoren tropfenweise und unter ständigem Vortexen zu den vorbereiteten Hepes-Aliquots pipettiert. Nach 20 Minuten wurde der Transfektionsansatz vorsichtig ins Kulturmedium der 293T-Zellen überführt. Nach einer maximal 16-stündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und durch 7 mL frisches Medium ersetzt. Wahlweise wurden an dieser Stelle für die entsprechenden Versuche die Kulturbedingungen variiert (siehe Abschnitt 4.1.5). Nach dem Mediumwechsel kann die Transfektionseffizienz anhand der *GFP*-Expression des Reportergens mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert werden. Vierundzwanzig und 36 Stunden nach der Transfektion wurde der Kulturüberstand der Zellen mit den sekretierten HCVpp gesammelt und sterilfiltriert. Der Überstand kann direkt zur Infektion von Zellen verwendet werden oder er wird durch Ultrazentrifugation mit Hilfe eines 20-prozentigen Saccharosekissens konzentriert (2,5 Stunden, 25000 rpm, 4 °C).

3.3.2 Infektion von Huh7-Zellen mit HCV-Pseudotypen

Nach erfolgreicher Infektion von Huh7-Zellen mit HCVpp wird die in den Pseudotypen verpackte RNA, durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben. Die DNA, welche für das Reportergen *gfp* kodiert, wird stabil ins Wirtsgenom integriert und exprimiert. Die Expression des *gfp* lässt sich mikroskopisch oder durch cytometrische Messung nachweisen (siehe Abschnitt 3.4.5). Die Infektion von Huh7-Zellen erfolgte je nach Versuch in 24- oder 96-*well*-Kulturschalen, wenn nicht gesondert angegeben unter Standardkulturbedingungen in DMEM mit 10 % FCS. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden vor der Infektion, je nach verwendeter Kulturschale, in einer Dichte von 4×10^4 oder 5×10^3 Zellen mL^{-1} in DMEM-Medium ausgesät. Zur Infektion der Zellen wurden entweder 50 μL konzentrierte Pseudotypen oder 50 μL

Zellüberstand mit den sekretierten Pseudotypen zu den Zellen pipettiert. Je nach Versuchsbedingungen wurden die Zellen für 2 Stunden bei 2000 rpm zentrifugiert oder direkt im Brutschrank inkubiert. Vierundzwanzig Stunden nach Zugabe der Pseudotypen wurde das Zellmedium durch frisches Medium ersetzt. Zur Kontrolle der HCV-Spezifität wurde stets ein Kontroll-Pseudotyp verwendet (jeweils im Ergebnisteil angegeben). Bei der Auswertung der Infektiösität der HCVpp wurden die Ergebnisse mittels dieser Kontrollen normiert (siehe Ergebnisteil).

3.3.3 HCV-Neutralisationstest

Zur Messung neutralisierender Antikörper gegen HCV wurden 20 μ L HCVpp mit Patientenseren in einer 200-fachen Verdünnung mit PBS für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Huh7-Zellen mit den vorbehandelten Pseudotypen wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, infiziert. Neutralisierende Antikörper binden an die Hüllproteine der Pseudotypen und inhibieren dadurch deren Infektiösität, was als Abnahme der Expression des Reportergens cytometrisch detektierbar ist. Die Ergebnisse wurden auf die Pseudotypen-Infektiösität, nach Behandlung mit HCV-negativem Serum normiert.

3.3.4 Präparation nativer HCV aus Patientenseren

Die Präparation nativer Viren aus Patientenseren erfolgte mittels einer Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe eines selbstgeformten Iodixanol-Dichtegradienten (OptiPrep, Axis-Shield). Hierzu wurde eine 25 prozentige (w/v) Iodixanol-Arbeitslösung, bestehend aus Iodixanol und DMEM-Medium hergestellt. Anschließend wurden jeweils 15 mL der Iodixanol-Lösung in dickwandige Polykarbonat-Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und mit 1 mL Patientenserum gemischt. Während einer 24-stündigen Zentrifugation bei 25000 rpm und 4 °C entsteht aufgrund der Zentrifugalkraft ein selbstgeformter Dichtegradient. Die Viruspartikel und andere Serumbestandteile werden während der Zentrifugation entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Für die Zentrifugation wurde ein Festwickelrotor (Beckman TI65.1) verwendet. Festwinkelrotoren sind aufgrund ihrer kürzeren Sedimentationsstrecke gegenüber Ausschwingrotoren für die Herstellung eines Gradienten zu bevorzugen. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Gradient vorsichtig in jeweils 1 mL Fraktionen aufgetrennt. Um diejenigen Fraktionen in denen sich die Viren aufgrund ihrer buoyant Dichte angereichert haben zu identifizieren, wurde mit Hilfe einer *real time* PCR (siehe Abschnitt 3.2.7) die HCV-RNA in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Dichte der gesammelten Fraktionen wurde durch Messung der Absorption der Fraktionen (in DMEM 10000-fach

verdünnt) bei einer Wellenlänge von 244 nm, was dem Absorptionsmaximum von Iodixanol entspricht, bestimmt. Mit Hilfe der vom Hersteller angegebenen Beziehung zwischen Absorption und Dichte wurde die Dichte der gemessenen Fraktionen berechnet.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Karlsruhe) und RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium (Gibco, Karlsruhe) wurden standardmäßig mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS)(Gibco, Karlsruhe) und mit 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA-Laboratories, Linz) versetzt.

Zur Produktion von HCVpp in 293T-Zellen wurde die Zugabe von Serum zum Medium variiert. Je nach Versuchsansatz wurde dem DMEM wahlweise 0,1 % FCS oder 2 % humanes Serum zugesetzt. Ebenso wurden die Huh7 Zellen zur Infektion mit Pseudotypen wahlweise in DMEM mit 2 % humanem Serum kultiviert.

Die verschiedenen Zellen wurden in speziellen Brutschränken in wassergesättigter Atmosphäre, bei 7 bis 7,5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Je nach Art des Versuches wurden die Zellen in Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 100 x 20 mm oder in 24-, 48- oder 96-*well*-Kulturschalen gezüchtet. Konfluente Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % in PBS)(PAA-Laboratories, Linz) von der Kulturschale abgelöst. Je nach gewünschter Zelldichte wurden die trypsinierten Zellen in geeigneten Verdünnungen auf neue, mediumhaltige Kulturschalen verteilt.

Tabelle 3.5: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen

Zelllinie	Herkunft	Spezies	Medium
Huh7	Hepatom-Zelllinie	Mensch	DMEM
293T	embryonale Nierenzelllinie	Mensch	DMEM
primäre PBMCs	Blut	Mensch	RPMI

3.4.2 Isolierung von periphären, mononukleären Zellen aus Blutproben

Die Separation von periphären, mononukleären Zellen (PBMC) aus Vollblut beruht auf einer Dichtegradientenzentrifugation. Während der Zentrifugation werden PBMCs aufgrund ihrer Dichte von Erythrozyten und Granulozyten separiert und in einer Interphase zwischen der Plasmafraktion und dem Separationsmedium angereichert. Zur Isolierung von PBMC wurden circa 100 mL Vollblut von gesunden Probanden entnommen und in EDTA-Röhrchen aufbewahrt. Das Blut wurde im Verhältnis 1:3 mit PBS gemischt und zu je 30 mL in Schraubgefäße (50 mL) gefüllt. Anschließend wurden unter das Blut/PBS-Gemisch mit einer 10 mL Pasteurpipette vorsichtig 12 mL Ficoll-PaqueTM (Amersham Biosciences) unterschichtet. In einem darauffolgenden Zentrifugationsschritt (25 min, 2000 rpm, 25 °C) wurden die PBMC, in einem Ausschwingrotor ohne Bremsenwirkung, separiert. Die angereicherte Zellfraktion wurde vorsichtig in ein frisches Gefäß überführt und anschließend zwei mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl mit einem Hämatozytometer bestimmt und je nach gewünschter Zellzahl in geeigneten Verdünnungen in RPMI-Standardmedium ausgesät.

3.4.3 Stimulierung von PBMCs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PBMCs mit CD81-Antikörpern (MG81 und N81, freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe von S. Abrignani zur Verfügung gestellt), mit löslichen HCV-E2-Proteinen, mit HCVpp, mit nativen Hepatitis C Viren und mit SAC (Pansorbin-Cells, Calbiochem) stimuliert. SAC ist eine *Staphylococcus aureus* cowan Zellsuspension, die als positiver Stimulus von B-Lymphozyten bekannt ist. Zur Stimulation wurden 1×10^8 Zellen mL^{-1} ausgesät. Die CD81-Antikörper und HCV-Proteine wurden im Anschluss in einer Konzentration von $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ zu je 1×10^8 Zellen mL^{-1} hinzugefügt. Zur Stimulation mit HCVpp wurden je 100 μL konzentrierte Pseudotyp-Lösung eingesetzt. Zur Stimulation der PBMCs mit nativen Viren wurde eine standardisierte Menge mit je 10000 IU mL^{-1} (RNA-Konzentration) verwendet. Die Messung von Aktivierungsmarkern auf B-Lymphozyten infolge der Stimulation erfolgte cytometrisch nach 24 Stunden (siehe Abschnitt 3.4.6). Zur Messung der Antikörperproduktion infolge der Stimulation wurden die PBMCs nach 10 Tagen analysiert (siehe Abschnitt 3.6.3).

3.4.4 Transfektion von DNA in Eukaryonten-Zellen

Für die Transfektion von DNA in Eukaryonten-Zellen werden gegenwärtig mehrere Techniken wie z.B. die Elektroporation, die Kalziumphosphat-Kopräzipitation (siehe Abschnitt 3.3.1) oder die Transfektion mittels LipofektaminTM 2000 angewandt. Die Transfektion mit Lipofektamin beruht auf der Bindung der negativ geladenen DNA an positiv geladenen Liposomen. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 24-*well*-Kulturplatte in einem Volumen von 500 μL ausgesät. Für die Transfektion wurden 50 μg DNA in 50 μL DMEM-Medium gemischt. Parallel dazu wurden 2 μL Lipofektamin in 50 μL DMEM-Medium gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit dem Lipofektamin-Ansatz gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In jede Vertiefung der Zellkulturplatte wurden vorsichtig 100 μL der DNA-Lipofektamin-Lösung hinzugegeben. Nach 6 Stunden wurde das Medium durch frisches DMEM-Medium ersetzt.

3.4.5 Durchflusscytometrie

Die Durchflusscytometrie, auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) genannt, ist eine Methode zur Charakterisierung von Zellen. Hierbei werden suspendierte Zellen mit einem Laser angeregt, wodurch je nach Zelltyp charakteristische Lichtsignale gemessen werden und die Emission angeregter Fluoreszenzfarbstoffe in oder auf den Zellen analysiert und sortiert werden können. Die Funktionsweise wird hier kurz erläutert.

Durch eine Trägerflüssigkeit, worin sich die suspendierten Zellen befinden, wird eine laminare Strömung erzeugt. Durch eine Querschnittsverringering der Messküvette wird die laminare Strömung beschleunigt (hydrodynamische Fokussierung). Hierbei wird auch der Abstand der im Strom mitgeführten Zellen vergrößert, sodass jede Zelle einzeln den Laserstrahl passiert. Beim Auftreffen des Laserlichtes auf die Zelle tritt Licht entlang der Meßachse (180° Winkel) und in einem 90° Winkel aus der Zelle, was separat von 2 Photodioden detektiert wird. Das Licht, das entlang der Meßachse aus den Zellen tritt wird Forwärtstreulicht (FSC) genannt und bestimmt die relative Größe der Zelle. Das Licht, das von der Zelle im 90° Winkel streut wird Seitwärtstreulicht (SSC) genannt und ist ein Maß der relativen Granularität oder Komplexität der Zellen.

Neben Größe und Granularität lassen sich auch Fluoreszenzsignale verschiedener Fluorochrome detektieren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FACS-Messungen wurden mit einem FACS Calibur, einem vier-

Farben Analysegerät mit zwei Lasern durchgeführt. Die erste Anregungsquelle ist ein luftgekühlter Argonlaser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm aussendet. Die zweite Quelle ist ein Diodenlaser, der Licht von 635 nm sendet. Dadurch können Fluorochrome, welche im Bereich zwischen 488 nm und 635 nm absorbieren von den Lasern angeregt werden. Fluorochrome, die für simultane Färbungen bzw. Messungen geeignet sind haben Emissionsspektren, deren Maxima ausreichend voneinander entfernt sind. Die Spektren dieser Fluorochrome werden in vier Fluoreszenzkanäle eingeteilt. In Tabelle 3.6 sind geeignete Fluorochrome mit den zugehörigen Kanälen, Absorptions- und Emissionsspektren aufgelistet. Die Datenauswertung erfolgte entweder mit dem Programm Cell Quest (Becton Dickenson) oder mit dem Programm WinMDI (frei zugängliche Software von J. Trotter).

Bei der Analyse der Infektion von HCVpp wurden vitale Huh7-Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität durch Messung des FSC und SSC als Population definiert. Nachdem 10000 Zellen innerhalb dieser Population gemessen wurden, wurde der Anteil der GFP-positiven Zellen bestimmt, indem die GFP-Fluoreszenz gegen die Zellgröße aufgetragen wurde. Anschließend wurde der prozentuale Anteil positiver Zellen mit Hilfe der oben genannten Software statistisch berechnet.

3.4.6 Färbung von B-Lymphozyten mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern

Auf der Zelloberfläche von Leukozyten befinden sich Differenzierungsantigene, die sog. *cluster of differentiation* (CD-Antigene). Einige dieser CD-Antigene sind zelltypspezifisch während andere spezifisch infolge einer Aktivierung (sog. Aktivierungsmarker) der Zelle exprimiert werden. Mit Hilfe dieser Oberflächenmarker, die durch monoklonale Antikörper identifiziert werden können, lassen sich die verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen differenzieren und deren Aktivierungsstatus feststellen. Zur Selektion der B-Lymphozyten wurden die PBMCs mit einem B-Zell-spezifischen CD19-Antikörper, der mit dem Fluorochrom APC konjugiert ist, gefärbt. Zur Un-

Tabelle 3.6: Fluoreszenzspektren gebräuchlicher Fluorochrome

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Fluoreszenzkanal
FITC	495	519	FL1
PE	480/565	578	FL2
PerCP	490	675	FL3
APC, CY5	650	660	FL4

tersuchung des Aktivierungsstatus der Zellen wurde die Expression von zwei Aktivierungsmarkern CD71 und CD86 untersucht. Durch eine Zweifachfärbung der PBMCs mit CD19 und mit PE-konjugierten CD71 oder CD86 Antikörpern wird der Aktivierungsstatus der B-Lymphozyten, wie in Abbildung 3.2 exemplarisch gezeigt, cytometrisch bestimmt. 1×10^8 Zellen wurden für 30 min mit den jeweiligen Antikörperkombinationen inkubiert. Anschließend

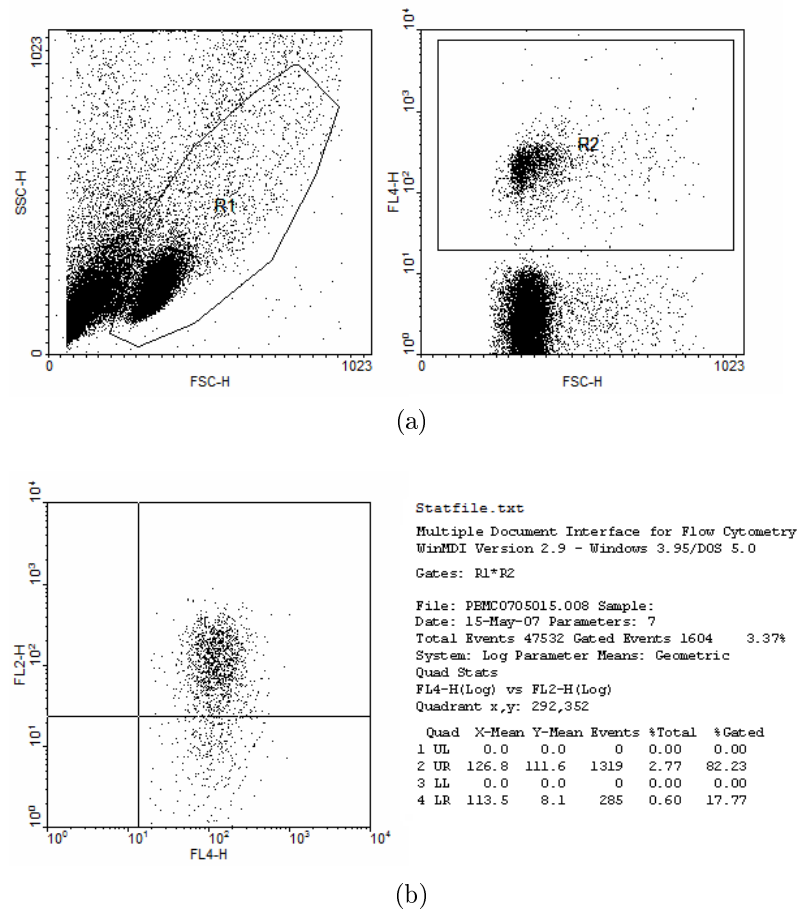


Abbildung 3.2: Analyse der FACS-Messung zur prozentualen Bestimmung aktivierter B-Lymphozyten. a) *Linkes Bild*: Definition der Lymphozytenpopulation anhand von Zellgröße und Komplexität mit Hilfe des FSC und SSC (R1); *Rechtes Bild*: Definition der B-Lymphozyten (R2) durch Selektion der fluoreszierenden CD19-positiven Zellen (FL4/APC) b) Bestimmung der aktivierten CD19-positiven B-Lymphozyten (FL4) anhand der PE-Fluoreszenz (FL2). Die PE-positiven Zellen werden im rechten oberen Quadranten angezeigt. Die Werte können dem Statistik-File entnommen werden. Der Analyse liegen 5000 gemessene Zellen zugrunde. FSC (Forwärtsstreuung), SSC (Seitwärtsstreuung), R (Region), FL (Fluoreszenzkanal), APC (Allophycocyanin), PE (Phycocyanin)

wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 3 mal mit PBS (+10 % FCS) gewaschen. Durch statistische Berechnung auf Grundlage von 5000 Messpunkten innerhalb der B-Lymphozytenpopulation wurde der prozentuale Anteil aktivierter B-Zellen bestimmt.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie

Rekombinante, Histidin-markierte Proteine können durch eine spezielle Methode der Affinitätschromatographie, die sogenannte immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC), gereinigt werden. Hier wurde zur Isolierung der Histidin-E2-Fusionsproteine Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) Sepharose (Superflow, Qiagen) verwendet. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der reversiblen Bindung des Histidins an immobilisierte Ni^{2+} -Ionen. Die Ni^{2+} -Ionen bilden über 4 Koordinationsstellen einen Chelatkomplex mit Nitrilotriessigsäure, wobei zwei verbleibende Stellen durch zwei Histidine besetzt werden. Die Elution gebundener Histidin-markierter Proteine erfolgt mit Imidazol-haltigem Puffer. Imidazol bindet ebenfalls an die Ni-NTA Matrix und verdrängt in geeigneter Konzentration die gebundenen Histidinreste.

Vor der Proteinaufreinigung wurde die Ni-NTA-Sepharose mit Waschpuffer gewaschen. Der proteinhaltige Zellüberstand wurde 24 Stunden nach Transfektion gesammelt und mit jeweils 300 μL Ni-NTA-Sepharose für 1 Stunde bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde der Zellüberstand zusammen mit der Sepharose in Poly-Prep Chromatographie-Säulen (Sigma-Aldrich) gefüllt. Das Säulenmaterial wurde mit 0,5 L Waschpuffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit jeweils 250 μL Elutionspuffer in 4 Fraktionen aufgeteilt. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde mittels einer Bradford Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 3.5.2) gemessen und in einem Western-Blot (siehe Abschnitt 3.5.4) kontrolliert. Als Kontrolle wurde der Zellüberstand von nicht transfizierten Zellen parallel zu den transfizierten Zellüberständen analysiert.

Waschpuffer	
NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
pH = 8,0	

Elutionspuffer	
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
pH = 8,0	

3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue. Durch die Proteinbindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 auf 595 nm. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von Eichgeraden mit bekannter Proteinkonzentration (BSA-Konzentrationsreihe von 0 bis 20 µg µL⁻¹). Nach der Zugabe von 20 µL der zu bestimmenden Proteinlösung zu 800 µL Bradford-Reagenz wurde die Absorption der Lösung in einem Spektropotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.5.3 Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Eine Technik, Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts zu trennen, beruht auf der Zugabe eines anionischen Detergens, dem Natriumdodecylsulfat (SDS), welches sich mit Proteinen zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen verbindet. Damit ist die spezifische Ladung der Proteine nicht mehr entscheidend für ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Innerhalb einer Gelmatrix aus hydrolysierten, quervernetzten Polymeren ist somit im Wesentlichen nur noch die Proteingröße für das Wanderungsverhalten entscheidend. Zur Auftrennung der Proteine werden zwei Gele mit unterschiedlicher Porengröße verwendet. Über ein engmaschiges Trenngel, in welchem die effektive Auftrennung der Proteine erfolgt, wird ein sogenanntes Sammelgel gegossen, das durch seine weitmaschigen Poren die Proteine auf einer Laufhöhe vereint. Beim Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Bei der Vorbereitung zum Gießen des SDS-Gels ist es wichtig, dass das TEMED erst unmittelbar vor dem Gießen zugesetzt wird, da es als Katalysator für die Polymerisation des Gels dient.

Sammelgel 12 %	
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	12 mL
1 M Tris/HCL, pH=8,8	7,5 mL
20 % SDS	0,15 mL
10 % Amonium Persulfat (APS)	0,15 mL
TEMED	0,02 mL
H ₂ O	10,2 mL
Trenngel	
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	0,67 mL
1 M Tris/HCL, pH=6,8	1,25 mL
10 % Amonium Persulfat (APS)	0,025 mL
TEMED	0,005 mL
H ₂ O	3 mL
Elektrophorese-Puffer	
Tris-Cl, pH 8,3	15,1 g
Glycin	94 g
20 % SDS	25 mL
H ₂ O	ad 1000 mL

3.5.4 Western-Blot

Um die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine immunologisch nachzuweisen, wurden sie von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese Übertragung erfolgte durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, wobei die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran transferiert werden. Dazu wurde das Trenngel luftblasenfrei auf die Membran gelegt, zwischen zwei Metallplatten eingeklemmt und in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Apparatur eingehängt. Der Blot erfolgte bei 150 mA. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren wurde diese mit 5 prozentiger Milch-TBST-Lösung vorbehandelt.

Der Nachweis der Zielproteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgte durch immunologische Detektion. Hierzu wurde die Membran mit einem Primärantikörper in geeigneter Verdünnung für 1 Stunde auf dem Tischschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 mal je 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper in geeigneter Verdünnung. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit TBST-Puffer erfolgte der immunologische Proteinnachweis (siehe Abschnitt 3.6.1).

Transfer-Puffer	
150 mM Glycin	
20 mM Tris-Cl, pH 8,3	
20 % Methanol	

TBST-Puffer

150 mM NaCl
20 mM Tris-Cl, pH 8,3
0,1 % Tween 20

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Western-Blot Entwicklung - Immunologischer Proteinnachweis

Die Sichtbarmachung der mittels Western-Blot immunologisch-markierten Proteine erfolgte mit dem *enhanced-chemiluminescence*-Detektionskit (ECL) der Firma Amersham. Hierbei wurden die mit dem Sekundärantikörper gekoppelten Proteinbanden durch das Licht eines oxidierten Substrates mit Hilfe eines Röntgenfilms nachgewiesen. Die Detektionsreagenzien wurden nach Anleitung des Herstellers gemischt und ca. 5 Minuten mit der Nitrocellulosemembran inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgetupft und die Membran luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschlagen. In einer Filmkassette wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und belichtet.

3.6.2 Immunologischer Nachweis der E1/E2-Expression

Der immunologische Nachweis der E1/E2-Expression auf der Zelloberfläche von 293T-Zellen erfolgte 24 Stunden nach Transfektion mit Hilfe von reaktiven Patientenseren. Dabei handelte es sich um diejenigen Seren, die zur Amplifikation der E1/E2-Sequenzen benutzt wurden. 293T-Zellen (1×10^5 Zellen) wurden 24 Stunden nach Transfektion der HCV-E1/E2-Expressionsvektoren für 30 Minuten mit Patientenseren in 10-facher Verdünnung mit PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Gebundene E1/E2-Antikörper wurden mit einem sekundären PE-gekoppelten anti-*human*-Antikörper in einer 100-fachen PBS-Verdünnung für 10 Minuten markiert. Daraufhin erfolgte wieder ein dreifacher Waschschrift mit PBS. Der statistischen Berechnung der PE-Fluoreszenz lagen 10000 cytometrisch gemessene Zellen zugrunde. Als Referenz diente eine Transfektion mit einem Kontrollvektor (M289 ohne HCV-E1/E2).

3.6.3 *Enzyme-linked immuno sorbent assay*

Der *Enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, dass auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Mit

dieser Technik können z.B. Proteine, Viren, Hormone und andere Verbindungen qualitativ oder quantitativ nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde ein quantitativer Elisa zur Bestimmung der IgM Antikörperproduktion von stimulierten B-Lymphozyten gemessen.

Für den Elisa wurden 2 Antikörper verwendet, die an unterschiedlichen Epitopen des zu messenden Antigens (IgM) binden. Mit einem Ziege anti-*human* IgM Antikörper (Bethyl Laboratories) wurde jede Vertiefung der Elisa-Platte (96-*well*-Kulturplatte) mit einer Antikörperkonzentration von je $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ unter Verwendung von *Coating*-Puffer beschichtet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurde die Platte 3 mal mit Waschpuffer gewaschen und für weitere 30 Minuten mit einem BSA-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Platte wieder 3 mal gewaschen und es folgte die Zugabe von $100 \mu\text{L}$ des zu messenden Antigens. Nach einer Stunde wurde die Platte erneut 3 mal gewaschen, sodass nur die gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexe zurückbleiben. Die Detektion der gebundenen Antigene erfolgte durch die Zugabe des zweiten, Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpers (Ziege anti-*human* IgM, HRP-konjugiert, Bethyl Laboratories) in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ pro Mikrotiterplatten-Vertiefung unter Verwendung des Probenverdünnungspuffers. Nach einer Stunde wurden ungebundene Antikörper durch weitere Waschschrte entfernt. Die Zugabe von $100 \mu\text{L}$ gebrauchsfertiger TMB (Tetramethylbenzidine)-Substratlösung führte zu einer Substrat-Hydrolyse durch die Meerrettichperoxidase unter Bildung einer blau gefärbten Lösung des reduzierten Substrates. Nach ca. 15 Minuten wurde die Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (2 M) gestoppt. Die Bildung des Farbstoffs ist direkt proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und kann spektralphotometrisch (Tecan SunriseTM, Mikrotiterplatten Photometer) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt werden. Die quantitative Bestimmung der IgM Konzentration beruht auf der Erstellung einer Eichgeraden. Hierzu wurde parallel zu den zu analysierenden Proben eine Verdünnungsreihe, die mit Hilfe von kalibriertem humanem Serum (Bethyl Laboratories, Frankfurt) hergestellt wurde, photometrisch gemessen. Die Verdünnungsreihe reicht von 500 ng mL^{-1} IgM bis 7 ng mL^{-1} IgM.

Coating Buffer, pH 9,6	
CaCO ₃ /2CaCO ₃	0,05 M
Waschpuffer, pH 8,0	
Tris	50 mM
NaCl	0,14 M
Tween 20	0,05 %

BSA-Puffer, pH 8,0

Tris	50 mM
NaCl	0,14 M
BSA	1 %

Probenverdünnungspuffer, pH 8,0

Tris	50 mM
NaCl	0,14 M
BSA	1 %
Tween 20	0,05 %

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Produktion von HCV-Pseudotypen

4.1.1 Amplifikation der HCV-E1/E2-Gene zur Herstellung einer Konsensussequenz

Zur Untersuchung der Entwicklung der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie wurden HCVpp Varianten verschiedener Geno- und Subtypen als Modellsystem benutzt.

Zur Herstellung der rekombinanten Viruspartikel wurden HCV infizierte Patienten, welche zusätzlich eine akute Kryoglobulinämie aufwiesen, ausgewählt. Aus deren Seren (siehe Tabelle 4.1) wurden cDNAs, die die Hüllproteine E1/E2 kodieren, hergestellt. Als spätere Experimentalkontrollen dienten cDNAs, welche aus Kryoglobulinämie-negativen Patientenseren (Tabelle 4.1) gewonnen wurden.

Da die letzten 60 C-terminalen Aminosäuren des Core-Gens eine hydro-

Tabelle 4.1: Klinisch charakterisierte Seren zur Amplifikation der HCV-E1/E2-Sequenz

Genotyp	Serumnummer	gemischte Kryoglobulinämie
1	22057	ja
	85	nein
2	11632	ja
	21693	nein
3	21949	ja
	21952	nein

phobe Region kodieren, die für die korrekte posttranslationale Prozessierung der Hüllproteine entscheidend ist, wurden sämtliche Konstrukte mit einer entsprechenden N-terminalen Core-Sequenz ausgestattet. Die HCV-RNA wurde aus den jeweiligen Patientenseren isoliert (siehe Abschnitt 3.2.1) und durch eine RT-PCR (siehe Abschnitt 3.2.4) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Die Amplifizierung der HCV-Core_{c-Terminus}-E1/E2-Sequenz erfolgte in einer semi-nested-PCR (siehe Abschnitt 3.2.5) mit Genotyp 1, 2 und 3 spezifischen Primern (Tabelle 3.1), die unter Verwendung von veröffentlichten Prototyp-Sequenzen entworfen wurden (Tabelle 4.2). Dabei hängen diese Primer die für die Klonierung notwendigen 5'-EcoRI und 3'-EcoRV- bzw. XhoI Schnittstellen (für Genotyp 3) an die gewünschten HCV-Sequenzen an. Die amplifizierten Konstrukte wurde anschließend in den pCR-XL-TOPO-Vektor kloniert (siehe Abschnitt 3.2.10).

Da das HCV-Genom aufgrund der fehlenden 3'→5' Exonukleaseaktivität seiner viruskodierten RNA-Polymerase mit einer hohen Fehlerrate repliziert wird, liegen in einem Patientenisolat immer mehrere Populationen eng verwandter Sequenzen vor, die sog. Quasispezies. Um Quasispezies bedingte, funktionale Unterschiede zu nivellieren, wurde ausgehend von 5 verschiedenen Sequenzen eine Konsensussequenz berechnet.

Die im Folgenden gezeigten Konsensussequenzen wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese (siehe Abschnitt 3.2.6) und unter Verwendung der im Anhang gezeigten Matrizen generiert. Die Bezeichnung auf der linken Seite gibt die auf der Serumnummer basierende Konsensussequenz mit dem zugrundeliegenden Genotyp und dem Vorhandensein einer Kryoglobulinämie (+/-MC) an. Die Positionen 61 und 253 sind als Beginn der E1- bzw. E2-Sequenz farblich hervorgehoben. Ferner sind die CD81 Bindungsstellen sowie die HVR1 und HVR2 gekennzeichnet. Die Analyse der Sequenzhomologie wurde mit Hilfe des Programms Bioedit Version 7.0.1/ClustalW erstellt.

Tabelle 4.2: Referenzen der Prototyp-Sequenzen (NCBI-Datenbank) zur Herstellung Genotyp-spezifischer Primer

Genotyp	Zugangsnummer	GI-Nummer	Isolat
1a	NC_004102	22127992	H77
1b	D00944	221650	HC-J6
2a	AB047639	13122261	JFH-1
3a	D28917	558520	HCV-K3a/650

Kapitel 4. Ergebnisse

		10	20	30	40	50	60
85	-HCV1b	-MC
22057	-HCV1a	+MC	DLMGYIPLVG	APLGGAARAL	AHGVRVLEDG	VNYATGNLPG	CSFSIFLLAL
21693	-HCV2b	-MC	-----V--	--V--V----	-----I-----	-----	-----V--V----
11632	-HCV2b	+MC	-----V--	--V--V----	-----I-----	-----	-----V----
21952	-HCV3a	-MC	-----	--V--V----	-----A----	I-F-----	-----F---IH--AS
21949	-HCV3a	+MC	-----	--V--V----	-----A----	I-F-----	-----F---IH--AS
----->E1							
		70	80	90	100	110	120
85	-HCV1b	-MC
22057	-HCV1a	+MC	YEVRNVSGVY	HVTNDCSNTS	IVYEAADMIL	HTPGCVPCVR	EGNSSRCWVA
21693	-HCV2b	-MC	-Q---ST-L-	-----P-S-	----TP-T--	-S-----	---T-S---P
11632	-HCV2b	+MC	V----I-SS-	YA----P-K-	-TWQLTNAV-	-L-----	EN DNGTL---
21952	-HCV3a	-MC	V----I-SS-	YA-----S-	-TWQLTNAV-	-L-----	EN DNGTLH--
21949	-HCV3a	+MC	L-W--T--L-	VL-----S-	----D-V--	-----Q	D--T-T--TP

		370	380	390	400	410	420
	
85	-HCV1b -MC	YAPRPGGIVP	ASQVCGPVYC	FTPSPVVVGT	TDHLGVPTYN	WGENATDVML	LNNTRPPQGN
22057	-HCV1a +MC	-S-K-----	-QN-----	-----	--RK-----	----D---FV	-----L--
21693	-HCV2b -MC	-P-K-----S	-RT-----	-----	--RQ-----S	----E---FV	--S-----A
11632	-HCV2b +MC	-P-----	-RT-----	-----	--KQ-----S	----E---F-	--S-----A
21952	-HCV3a -MC	-----EN--	--S-----	-----	--AK-A-----	--A-KS--F-	-ESL---S-R
21949	-HCV3a +MC	---K--TV-R	-K-----	-----	--AK---FR	----ES--F-	-ESL---N-R
					<-----	CD81-2-----	
		430	440	450	460	470	480
	
85	-HCV1b -MC	WFGCTWMNST	GFTKTCGGPP	CKIGGVGNN.	...TLVCPT	DCFRKHPEAT	YTKCGSGPWL
22057	-HCV1a +MC	-----S	---V--A--	-N------L-----	-----	-SR-----V
21693	-HCV2b -MC	-----G-	-----A--	-R-RRDY-G.	..TLD-L---	-----DT-	-L---A----
11632	-HCV2b +MC	-----G-	-----A--	-R-RKDH-G.	..TLD-L---	-----GT-	-L-----
21952	-HCV3a -MC	---S-----	--V---A--	-N-Y-D-R-S	QNESD-F---	-----	-SR--A----
21949	-HCV3a +MC	---S-----S	--V---A--	-N-Y-G-G-I	SNESD-F---	-----	-GR--A----
		->					
		490	500	510	520	530	540
	
85	-HCV1b -MC	TPRCLVDYPY	RLWHYPCTVN	FTIFKVRMYV	GGVEHRLNAA	CNWTRGERCN	LEDNRSELS
22057	-HCV1a +MC	-----H--	-----	Y-L-----	-----DV-	-----	-D-----
21693	-HCV2b -MC	--K-----S	-----	-----	-----S--	--F---D--R	-----GQQT
11632	-HCV2b +MC	-----	-----	-----	-----FS--	--F---D--R	-----GQQ-
21952	-HCV3a -MC	---M-----	-----	--L-----F-	--F---FT--	-----D	I-----QH
21949	-HCV3a +MC	---M-----	-----	--L-----F-	--F---FD--	-----D	I-----QQ
		550	560	570	580	590	600
	
85	-HCV1b -MC	PLLLSTTEWQ	VLPCSFTTLP	ALSTGLIHLH	QNIQDVQYLY	GIGSVVVGFA	IKWEYVLLLF
22057	-HCV1a +MC	-----Q--	-----	-----	-----	-V--SI-SW-	-----I---
21693	-HCV2b -MC	--H-----S	---T-SD--	-----M--	-----	-LSPAITYRI	V---W-V---
11632	-HCV2b +MC	--H-----A	I-----SD-	-----L--	-----	-LSPAITYRL	V---W-V---
21952	-HCV3a -MC	--H---LA	I-----PM-	-----	-----	-V--GM--W-	L---F-I-V-
21949	-HCV3a +MC	--H---LA	I-----PM-	-----	-----	-V--GM--W-	L---F-I-V-
		610	620				
				
85	-HCV1b -MC	LLLADARVCA	CLWMLLIAQ	AE*			
22057	-HCV1a +MC	-----I-S	-----S-	---			
21693	-HCV2b -MC	-----	---LI-LG-	---			
11632	-HCV2b +MC	-----	---LI-LG-	---			
21952	-HCV3a -MC	-----V	A--L--T-S-	---			
21949	-HCV3a +MC	-----V	A--L--T-S-	---			

Erwartungsgemäss zeigen die ersten 60 Aminosäuren des Core-Proteins die geringste Variabilität, während die HVR1 und die HVR2 die größten Unterschiede aufweisen. Die genetische Variabilität der einzelnen Konsensussequenzen wurde in Form einer zweidimensionalen Matrix analysiert (Tabelle 4.3), wobei im Folgenden auf mögliche Kryoglobulinämie bedingte Unterschiede eingegangen wird. Die Genotyp 1 Sequenzen 85 und 22057 zeigen eine Sequenzidentität von 80 %, wobei die Variabilität auf der Zugehörigkeit zu verschiedenen Subtypen beruht. Die Genotyp 2b Sequenzen 21693

Tabelle 4.3: Prozentuale Identität der HCV-Konsensussequenzen. Prozentuale Identitäten zwischen Sequenzen aus Kryoglobulinämie-positiven Seren sind rot und zwischen Sequenzen aus Kryoglobulinämie-negativen Seren blau dargestellt. Schwarz dargestellt sind prozentuale Identitäten zwischen den einzelnen Konsensussequenzen ohne Rücksicht auf Vorhandensein von Kryoglobulinämie.

Sequenz	85 HCV1b -MC	22057 HCV1a +MC	21693 HCV2b -MC	11632 HCV2b +MC	21952 HCV3a -MC	21949 HCV3a +MC
85 -HCV1b -MC	100	80	67	68	73	71
22057-HCV1a +MC	80	100	67	68	71	71
21693-HCV2b -MC	67	67	100	92	64	63
11632-HCV2b +MC	68	68	92	100	65	65
21952-HCV3a -MC	73	71	64	65	100	92
21949-HCV3a +MC	71	71	63	65	92	100

und 11632 sowie die Genotyp 3a Sequenzen 21952 und 21949 sind zu 92 % identisch. Demzufolge besteht trotz Zugehörigkeit zur selben Genotyp- und Subtypklasse eine genetische Variabilität in Höhe von 8 %, welche aufgrund von Unterschieden zwischen den einzelnen Patienten zustande kommt. Der Vergleich der Sequenzen zwischen den Kryoglobulinämie-positiven Gruppen (rote Werte in Tabelle 4.3), den Kryoglobulinämie-negativen Gruppen (blaue Werte in Tabelle 4.3) und den Sequenzen ohne Rücksicht auf das Vorhandensein einer Kryoglobulinämie (schwarze Werte in Tabelle 4.3), ergibt jedoch keine nennenswerten Homologieunterschiede.

Da die HVR1 als Bereich der größten Variabilität innerhalb des E2-Proteins bekannt ist (Kato et al., 1992; Weiner et al., 1991) und da das E2-Protein mit CD81 interagiert (Pileri et al., 1998), wird ein Zusammenhang zwischen der HVR1-Sequenz und der Entwicklung einer Kryoglobulinämie vermutet (Gerotto et al., 2001; Hofmann et al., 2004). Aus diesem Grund wurde die genetische Identität der 27 Aminosäuren umfassenden HVR1-Konsensussequenzen separat analysiert (Tabelle 4.4).

Im Vergleich zur oben beschriebenen Homologieanalyse der Gesamtsequenzen ergibt sich insgesamt eine geringere Identität zwischen 29 % und 57 % beim Vergleich der einzelnen Sequenzen ohne Rücksicht auf das Vorhandensein einer Kryoglobulinämie (siehe schwarze Werte in Tabelle 4.4). Interessanterweise erhöhen sich jedoch die Sequenzidentitäten, wenn der Vergleich innerhalb der Kryoglobulinämiegruppe erfolgt (siehe rote Werte in Tabelle 4.4). Ebenfalls erhöhen sich die Identitätswerte innerhalb der Gruppe ohne Kryoglobulinämie (siehe blaue Werte in Tabelle 4.4). Eine leichte Abweichung

Tabelle 4.4: Prozentuale Identität der HVR1-Konsensussequenzen. Prozentuale Identitäten zwischen HVR1-Sequenzen aus Kryoglobulinämie-positiven Seren sind rot und zwischen Sequenzen aus Kryoglobulinämie-negativen Seren blau dargestellt. Schwarz dargestellt sind prozentuale Identitäten zwischen den einzelnen HVR1-Konsensussequenzen ohne Rücksicht auf Vorhandensein von Kryoglobulinämie.

Sequenz	85 HCV1b -MC	22057 HCV1a +MC	21693 HCV2b -MC	11632 HCV2b +MC	21952 HCV3a -MC	21949 HCV3a +MC
85 -HCV1b -MC	100	36	50	36	61	29
22057-HCV1a +MC	36	100	43	50	43	50
21693-HCV2b -MC	50	43	100	57	50	32
11632-HCV2b +MC	36	50	57	100	46	43
21952-HCV3a -MC	61	43	50	46	100	36
21949-HCV3a +MC	29	50	32	43	36	100

von dieser Tendenz lässt sich beim Vergleich der Genotyp 2 mit Genotyp 3 Sequenzen erkennen. Der Grund hierfür könnte die höhere Ähnlichkeit zwischen Genotyp 2 Kryoglobulinämie-positiven und Kryoglobulinämie-negativen Sequenzen sein (Tabelle 4.4).

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass das Vorhandensein der Kryoglobulinämie trotz unterschiedlicher Geno- und Subtyp-Klassifizierung möglicherweise mit einer höheren Sequenzähnlichkeit assoziiert ist. Auffallend sind die Ergebnisse der HVR1 Homologieanalyse auch verglichen mit der Analyse, bei der die Gesamtsequenz verwendet wurde (vergleiche Tabelle 4.4 mit Tabelle 4.3). Bei letzteren konnten keine nennenswerten Homologieunterschiede zwischen den Kryoglobulinämie-positiven und Kryoglobulinämie-negativen Gruppen, verglichen mit den Sequenzen ohne Rücksicht auf Vorhandensein von Kryoglobulinämie, festgestellt werden.

Bei der hier dargestellten bioinformatischen Analyse handelt es sich lediglich um eine positionsabhängige Häufigkeitsverteilung der Aminosäuresequenzen. Um diese ersten statistischen Hinweise auf einen möglichen Einfluss der HVR1-Sequenz auf die Entstehung einer Kryoglobulinämie zu prüfen, erfolgte die Suche nach experimentellen Korrelationen mittels Pseudotypentechnologie. Im speziellen sollten mögliche Unterschiede in der Intensität und Art der Immunantwort als Folge von Pseudotypen Interaktion zwischen der Kryoglobulinämie-positiven und Kryoglobulinämie-negativen Gruppe analysiert werden.

4.1.2 Konstruktion der E1/E2-Expressionsvektoren

Die den Konsensussequenzen entsprechenden cDNAs wurden über die EcoRI- und EcoRV- bzw. XhoI- (Genotyp 3) Schnittstelle in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors M518 kloniert, welche sich unmittelbar am 3'-Terminus einer EMCV-IRES befindet. Anschließend wurde das Fragment bestehend aus EMCV-IRES, C-Terminus des Core-Gens, E1 und E2 über eine BamHI- und EcoRV- bzw. XhoI- (Genotyp 3) Schnittstelle in den Expressionsvektor M289 kloniert. Abbildung 4.1 zeigt eine exemplarische Karte der generierten Expressionsvektoren. Die klonierten Expressionsvektoren wurden entsprechend den Seren, woraus die Konsensussequenzen isoliert wurden, folgendermaßen genannt: p289/22057, p289/85, p289/11632, p289/21693, p289/21949 und p289/21952 (Tabelle 4.5).

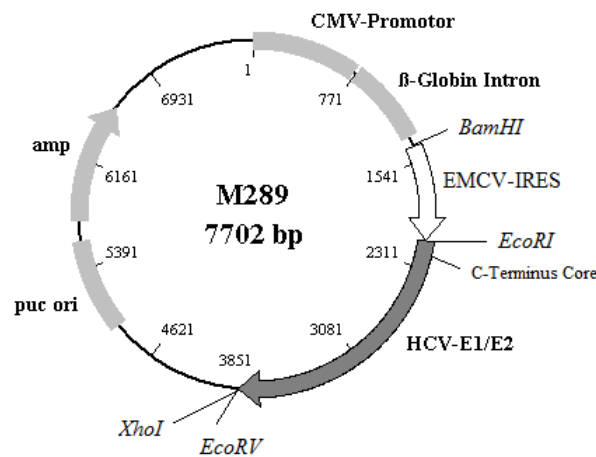


Abbildung 4.1: HCV-E1/E2-Expressionsvektoren. Die dargestellten Zahlen geben die Position der genetischen Elemente in Basenpaareinheiten relativ zum 5'-Terminus des CMV-Promotors an. CMV-Promotor: Region 1 bis 752, β -Globin Intron: Region 778 bis 1350, EMCV IRES: Region 1426 bis 2111, HCV-Core_{C-Terminus}E1/E2: Region 2112 bis 3965, puc plasmid replication site (ori): Region 5582 bis 4939, amp: Region 5730 bis 6590

4.1.3 Rekombinante Expression von E1/E2-Proteinen

Eine wichtige Voraussetzung zur Produktion infektiöser HCVpp ist die korrekte posttranslationale Prozessierung und die Exposition der HCV-Hüllproteine auf der Oberfläche der produzierenden Zellen (Michalak et al., 1997;

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der generierten Expressionsvektoren

Genotyp	Kryoglobulinämie	Vektorname
1	ja nein	p289/22057 p289/85
2	ja nein	p289/11632 p289/21693
3	ja nein	p289/21949 p289/21952

Sandrin et al., 2005). Zur Überprüfung der korrekten Proteinexpression und Exposition wurden deshalb 293T-Zellen mit den im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Expressionsplasmide (Tabelle 4.5) oder einem Kontrollvektor transfiziert (siehe Abschnitt 3.4.4).

Der immunologische Nachweis der E1/E2-Exposition auf den Zelloberflächen der 293T-Zellen wurde 24 Stunden nach erfolgter Transfektion mit Hilfe von reaktiven Patientenseren gezeigt (siehe Abschnitt 3.6.2). Gebundene E1- und E2-Antikörper wurden anschließend mit einem sekundären, PE-gekoppelten anti-*human*-Antikörper markiert. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde cytometrisch gemessen und mit Hilfe des Programms WinMDI Version 2.9 analysiert (Abbildung 4.2). Die erfolgreiche Expression und Exposition von HCV-Hüllproteinen auf 293T-Zelloberflächen konnte mit allen im Rahmen der Arbeit konstruierten Plasmide eindeutig nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, wurde nach Transfektion der Anteil der fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich erhöht.

Dabei wächst der Populationsanteil der fluoreszierenden 293T-Zellen nach Expression von Genotyp 1 Hüllproteinen auf 73 % und 93 %, bei Genotyp 2 auf etwa 45 % und 55 % und bei Genotyp 3 auf ungefähr 61 % an. Diese Ergebnisse bestätigten nicht nur die Klonierungsstrategie und die Funktionalität der Expressionsvektoren sondern darüber hinaus auch die erfolgreiche Expression und Exposition der Konsensus-Hüllproteine auf 293T-Zelloberflächen. Dies lieferte einen ersten Hinweis auf die Funktionalität der Vektoren für die folgende Pseudotypenproduktion.

4.1.4 Nachweis der Infektiosität von HCV-Pseudotypen

Nachdem die erfolgreiche Expression und Exposition von HCV-Hüllproteinen auf 293T-Zelloberflächen nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 4.1.3), wurden die konstruierten E1/E2-Expressionsvektoren zur Pseudotypisierung ver-

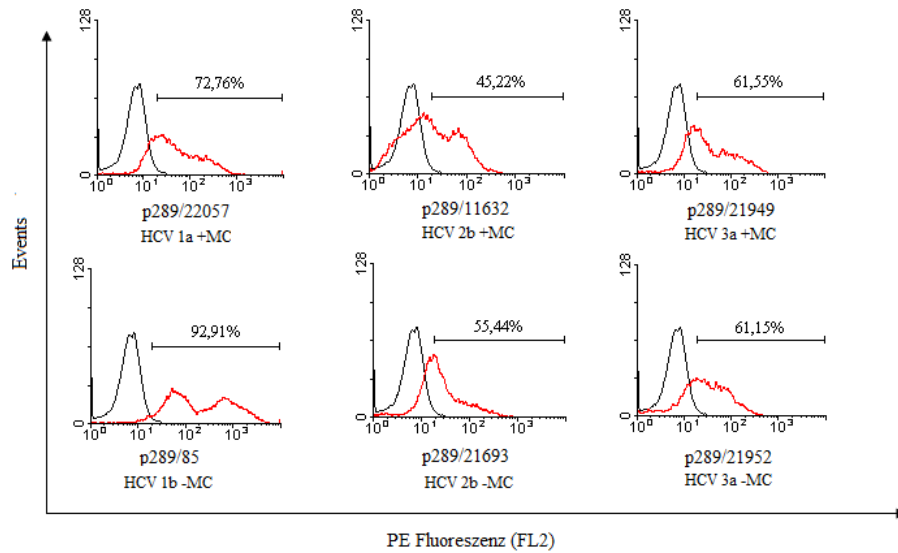


Abbildung 4.2: Untersuchung der E1/E2-Exposition auf der Zelloberfläche. Die zur Transfektion verwendeten Vektoren sind unterhalb des jeweiligen Histogramms gezeigt. Die Auswertung jeder Transfektion ist zusammen mit der Negativkontrolle (schwarze Linie) in einem Histogramm dargestellt.

wendet. Hierzu wurden 293T-Zellen unter Standardkulturbedingungen in DMEM mit 10 % FCS mit den retroviralen Vektoren (M38 und M2) transfiziert (siehe Abschnitt 3.3.1). Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium mit den sekretierten HCVpp gesammelt, mit Hilfe eines Saccharosekissens 100-fach konzentriert und zur Infektion von Huh7-Zellen verwendet (siehe Abschnitt 3.3.2). Der Anteil infizierter Huh7-Zellen wurde 48 Stunden nach Infektion durch Fluoreszenzmessung des exprimierten Reportergens cytomertisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.5). In Abbildung 4.3 ist die Infektion der Huh7-Zellen als Anteil fluoreszierender Zellen in Prozent angegeben, wobei alle Ergebnisse auf die Menge von GFP-positiven Zellen nach Infektion mit Pseudotypen ohne Hüllproteine normiert sind.

In Abbildung 4.3 sind die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Genotyp 2 HCVpp zeigen mit ca. 11 % die stärkste Infektiösität, während Genotyp 3 HCVpp mit ca. 1 und 2 % eine deutlich schwächere Infektiösität aufweisen. Obwohl sich die Infektiösität der einzelnen HCVpp erheblich unterscheidet, lässt sich generell feststellen, dass alle HCV-Hüllproteine zur Pseudotypisierung geeignet sind.

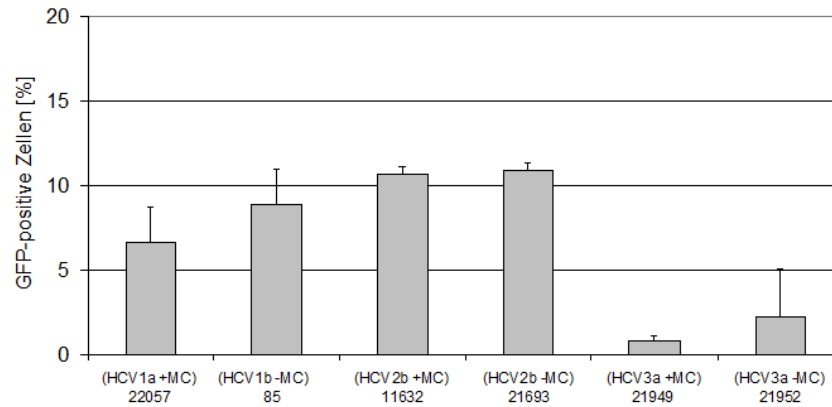


Abbildung 4.3: Infektiösität verschiedener HCVpp. Die Anzahl GFP-positiver Huh7-Zellen wurde nach Infektion mit den verschiedenen HCVpp cytometrisch gemessen. HCVpp-Genotyp, Vorhandensein einer Kryoglobulinämie (+/-MC) und die den HCVpp zugrundeliegende Seriennummer ist unterhalb der jeweiligen Säule angegeben.

4.1.5 Etablierung geeigneter Produktions- und Infektionsbedingungen für HCV-Pseudotypen

Aufgrund der anfänglich gemessenen, niedrigen Infektiösitäten (siehe Abschnitt 4.1.4), wurde durch Variation einiger Produktions- und Infektionsparameter versucht, geeignete Bedingungen für die Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten HCVpp zu erhalten. Untersuchungen mit HCVpp haben gezeigt, dass die Infektiösität durch Zugabe von humanem Serum gesteigert werden kann (Bartosch et al., 2005). Aus diesem Grund wurde die Serumart und Serumkonzentration im Kulturmedium der Produktions- und Zielzellen, sowie die Konzentration der Viruspartikel variiert.

Nach der Transfektion mit den jeweiligen retroviralen Vektoren M38 und M2 (siehe Abschnitt 3.3.1) wurden die 293T-Zellen entweder in DMEM mit 10 % FCS, in DMEM mit 0,1 % FCS oder in DMEM mit 2 % humanem Serum während der HCVpp Produktion kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gesammelt und entweder direkt zur Transfektion verwendet oder mit Hilfe eines 20 %-igen Saccharosekissens 100-fach konzentriert (konz HCVpp). Die anschließende Infektion der Huh7-Zellen erfolgte entweder in DMEM mit 10 % FCS oder 2 % humanem Serum. Nach Zugabe der HCVpp wurden die Zielzellen entweder weiter kultiviert oder einer 2-stündigen Zentrifugation unterworfen. Die Variation der genannten Faktoren und der Versuchsaufbau sind in Abbildung 4.4 skizziert.

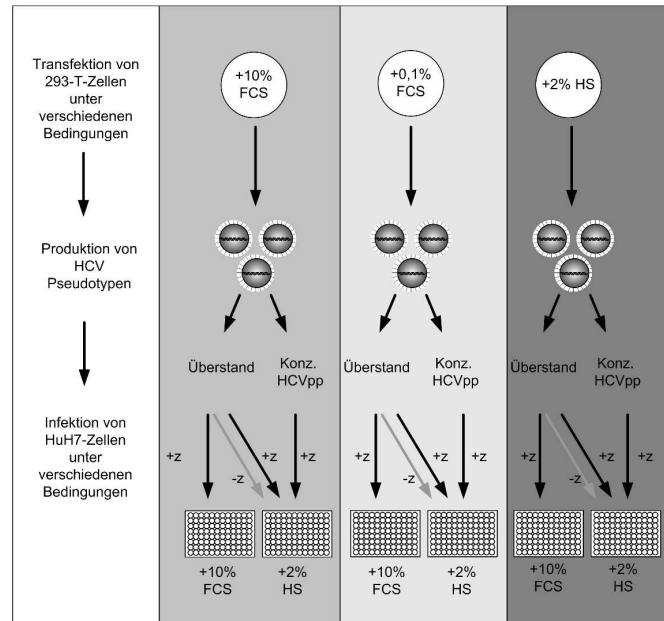
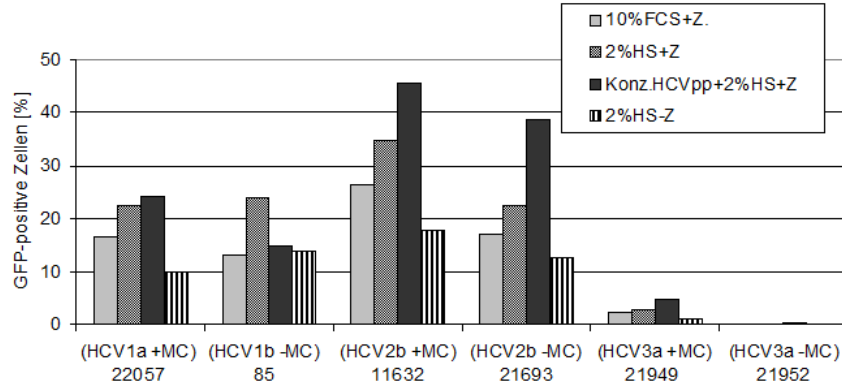


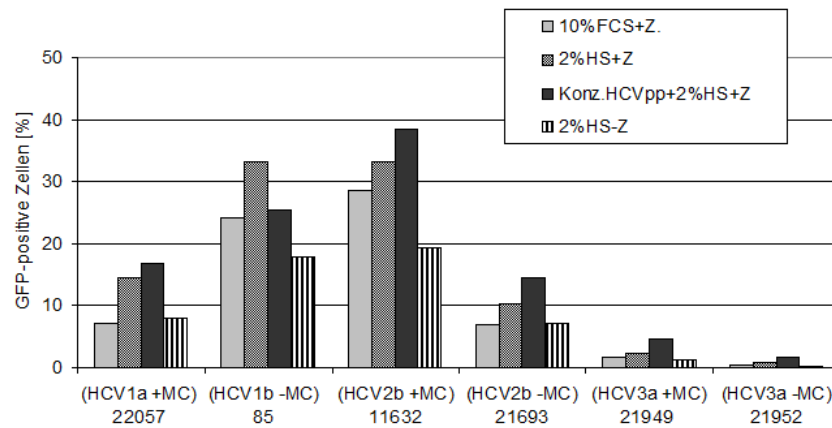
Abbildung 4.4: Produktions- und Infektionsbedingungen für die Herstellung von HCVpp; FCS: fötales Kälberserum; HS: humanes Serum; konz HCVpp: 100-fach konzentrierte HCVpp; +Z/-Z: Huh7-Zellen werden nach Infektion mit HCVpp zentrifugiert/nicht zentrifugiert.

Der Anteil infizierter Huh7-Zellen wurde 48 Stunden nach Infektion durch Fluoreszenzmessung des exprimierten Reportergens cytometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.5). In Abbildung 4.5 und 4.6 ist die Infektion der Huh7-Zellen als Anteil fluoreszierender Zellen in Prozent angegeben. Die drei Diagramme der Abbildung 4.5 und 4.6 zeigen die Infektionseffizienzen der HCVpp nach Produktion in DMEM mit 10 % FCS (Abbildung 4.5a), in DMEM mit 2 % humanem Serum (Abbildung 4.5b) und in DMEM mit 0,1 % FCS (Abbildung 4.6). Ähnlich wie im Abschnitt 4.1.4 festgestellt, zeigen in dieser Versuchsreihe unter allen Produktionsbedingungen die Genotyp 2 pseudotypisierten HCVpp (11632; 21693) die höchste Infektiosität und die Genotyp 3 pseudotypisierten HCVpp die schwächste Infektiosität (21952 und 21949).

Analyse verschiedener Infektionsbedingungen: unabhängig von den gewählten Produktionsbedingungen, kann eindeutig ein positiver Effekt von humanem Serum während der Infektion gezeigt werden. Die Infektiosität von unkonzentrierten HCVpp lässt sich durch die Anwesenheit von humanem Serum unabhängig vom verwendeten Genotyp um 4,5 Prozentpunkte steigern, verglichen mit der Infektion unter Standardkulturbedingungen in DMEM mit 10 % FCS (Abbildung 4.5 und 4.6, vergleiche hellgrau mit mittelgrau).



(a)



(b)

Abbildung 4.5: Infektiösität verschiedener HCVpp produziert in DMEM +10 % FCS(a) und DMEM +2 % HS(b). Die Infektiösität der HCVpp im Zellüberstand und nach 100-facher Konzentrierung wurde unter verschiedenen Bedingungen analysiert: Huh7-Zellen wurden mit 100 μ L Zellüberstand in 10 % FCS und 2 % HS, sowie mit 50 μ L konzentrierten HCVpp in 2 % HS infiziert. HCVpp-Genotyp, Vorhandensein einer Kryoglobulinämie (+/-MC) und die den HCVpp zugrundeliegende Serumnummer ist unterhalb der jeweiligen Säule angegeben. +Z/-Z: Huh7-Zellen wurden nach Infektion zentrifugiert/nicht zentrifugiert.

en Balken). Eine zusätzliche Konzentrierung der Pseudotypen führt zu einer weiteren Steigerung der Infektiösität aller Pseudotypen mit Ausnahme der auf Serum 85 basierenden Partikel (Abbildung 4.5 und 4.6, vergleiche mittelgraue mit dunklegrauen Balken). Der Konzentrierungsschritt führt tenden-

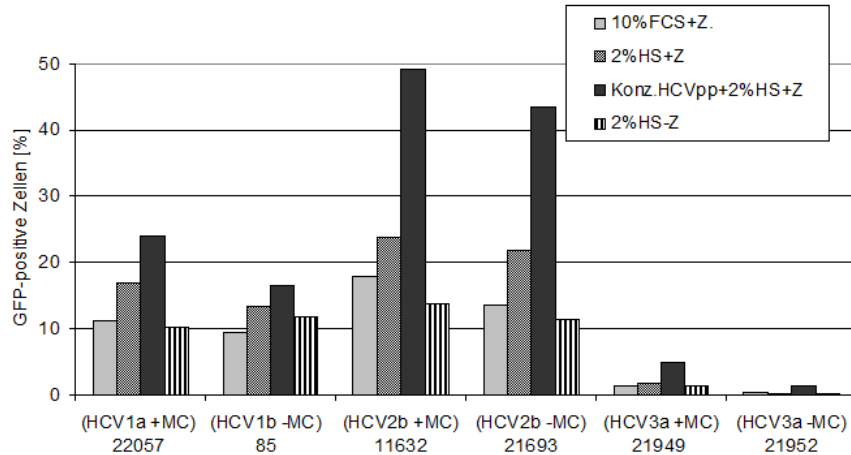


Abbildung 4.6: Infektiösität verschiedener HCVpp produziert in DMEM +0,1 % FCS. Die Infektiösität der HCVpp im Zellüberstand und nach 100-facher Konzentrierung wurde unter verschiedenen Bedingungen analysiert: Huh7-Zellen wurden mit 100 μ L Zellüberstand in 10 % FCS und 2 % HS, sowie mit 50 μ L konzentrierten HCVpp in 2 % HS infiziert. +Z/-Z: Huh7-Zellen wurden nach Infektion zentrifugiert/nicht zentrifugiert.

ziell bei HCVpp, welche in DMEM mit 0,1 % FCS produziert wurden, zu den höchsten Steigerungen der Infektiösität (Abbildung 4.6). Innerhalb der HCVpp kann bei Partikeln mit Genotyp 2 Hüllproteinen die größte Steigerung der Infektiösität beobachtet werden. Darüber hinaus wird die Infektion mit allen HCVpp, in Anwesenheit von 2 % humanem Serum, durch einen Zentrifugationsschritt während der Infektionsphase unabhängig von den Produktionsbedingungen erheblich verbessert (Abbildung 4.5 und 4.6, vergleiche mittelgraue mit gestreifte Balken).

Analyse verschiedener Produktionsbedingungen: die Auswirkungen der Produktionsbedingungen der Pseudotypen auf deren Infektiösität lassen sich nicht generalisieren. Die Substitution von FCS durch humanes Serum während der Pseudotypenproduktion führt nicht überzeugend zu einer Steigerung der Infektiösität der HCVpp (vergleiche Abbildung 4.5a mit 4.5b). Die einzige deutliche Steigerung konnte bei einem Genotyp 1-abgeleiteten HCVpp (Serum 85) gemessen werden. Die Gegenwart von FCS ist absolut notwendig zur HCVpp Produktion, da die Reduktion der FCS Konzentration insgesamt zu einer Erniedrigung der HCVpp Infektiösität führt (vergleiche Abbildung 4.5a mit Abbildung 4.6). Im Falle der Genotyp 1 und 2 HCVpp kann dieser negative Effekt während der Infektion der Zielzellen durch Konzentrierung der HCVpp kompensiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Infektionsprozess der

Zielzellen das kritische Element bei der Verwendung von HCVpp darstellt. Zum Beispiel ist die Anwesenheit von humanen Serum während der HCVpp Produktion von untergeordneter Rolle während der Infektionsprozess durch humanes Serum deutlich erleichtert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch eine 100-fache Konzentrierung der HCVpp und eine der Infektion nachgeschaltete Zentrifugation der Zielzellen die Infektiösität der Partikel erheblich gesteigert werden kann.

Für alle weiteren Experimente wurden die HCVpp wie in Abbildung 4.5a gezeigt in 10 % FCS produziert, da hier insgesamt für alle Pseudotypen gute Infektiösitäten erzielt wurden. Die Infektion der Zellen erfolgte mit konzentrierten HCVpp in Anwesenheit von humanem Serum. Anschließend wurden die Zellen stets für 2 Stunden zentrifugiert.

4.2 Untersuchung der HCV-assozierten Kryoglobulinämie

4.2.1 Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes lassen sich nicht mit HCVpp infizieren

Neben dem Lebergewebe werden auch Lymphozyten als Orte der HCV Persistenz diskutiert, was mit der Entwicklung lymphoproliferativer Erkrankungen wie z. B. der Kryoglobulinämie in Zusammenhang gebracht wird. Die Kryoglobulinämie entsteht als Folge einer Störung der B-Zell Regulation. Anhaltspunkte für eine extrahepatische Replikation des HCV lieferten einerseits der Nachweis von Minus- und Plusstrang-RNA in PBMCs (Ferri et al., 2003; Lerat et al., 1996; Morsica et al., 1999) und andererseits, die erfolgreiche Infektion von B- und T-Lymphozyten mit HCV (Kato et al., 1995; Nissen et al., 1994; Shimizu et al., 1992). Mit Hilfe der in den Vorversuchen etablierten Produktions- und Infektionsbedingungen (Abbildung 4.5 a)), wurden frisch isolierte PBMCs mit den verschiedenen HCVpp inkubiert. Da es sich bei PBMCs um bereits ausdifferenzierte Zellen handelt, wurden die HCVpp mit Hilfe lentiviraler Vektoren (M420 und M334) produziert (siehe Abschnitt 3.3.1). Dabei konnte eine Infektion von T- oder B-Lymphozyten weder mit Pseudotypen deren Hüllproteine auf der Grundlage von Kryoglobulinämie-positiven Seren hergestellt wurden, noch mit Pseudotypen, deren Hüllproteine aus Kryoglobulinämie-negativen HCV-Seren stammen, gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Untersuchung der selektiven B-Zell Aktivierung durch HCV-Hüllproteine

Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Pseudotypensystems wurde eine möglicherweise Kryoglobulinämie-abhängige, verstärkte B-Zell Aktivität als Folge der Virusinteraktion untersucht. Da eine B-Zellaktivierung *in vitro* auch mit löslichem E2-Protein in Gegenwart eines monoklonalen CD81-Antikörper (MG81) möglich ist (Rosa et al., 2005), wurden neben den HCVpp auch lösliche E2-Proteine (sE2) in einer Konzentration von $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ verwendet (siehe Abschnitt 3.2.16 und Abschnitt 3.5.1). Für die Aktivierungsuntersuchung von B-Lymphozyten wurden frisch isolierte PBMCs von gesunden Probanden verwendet. Nach 24 Stunden wurde die Expression der späten Aktivierungsmarker CD71 und CD86 auf der Oberfläche von B-Lymphozyten mittels direkter, zweifacher Immunfluoreszenzmarkierung cytometrisch gemessen (siehe Abschnitt 3.4.6).

In Abbildung 4.7 sind die Ergebnisse der B-Zellaktivierung mit löslichen Proteinen und HCVpp zusammengefasst. Der Anteil der B-Lymphozyten Population, der die Aktivierungsmarker CD71 und CD86 exprimiert ist in Prozent angegeben. Eine *Staphylococcus aureus* *cowan* (SAC) Zellsuspension wurde als Positivkontrolle für die B-Zell Stimulation benutzt. Diese Zellen besitzen in ihrer Zellwand das sogenannte Protein A, dass für die Stimulation von B-Lymphozyten bekannt ist. Die Zugabe von SAC Zellsuspension führt zu einer Zunahme des fluoreszierenden B-Zell Anteils um jeweils 48 Prozentpunkten in beiden Fluoreszenzbereichen im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Wie von Rosa et al. (2005) beschrieben, führt die Stimulation von PBMCs mit zwei monoklonalen CD81-Antikörpern (MG81 und N81) auch im Rahmen dieser Arbeit zu einer deutlichen Zunahme der den Aktivierungsmarkern repräsentierenden Fluoreszenzbereichen um 61 (CD71) und 53 (CD86) Prozentpunkten. Wird allerdings der Antikörper N81 jeweils durch die löslichen E2-Formen ersetzt, lässt sich keine Änderung der Zellaktivierung im Vergleich zu unstimulierten Zellen oder zu Zellen, welche lediglich mit MG81 inkubierten wurden, erzielen (Abbildung 4.7 links). In Abbildung 4.7 ist die Kontrolle der E2-Konzentrationen in den Proteinpräparationen mittels Western-Blot unterhalb der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten gezeigt. In allen Präparationen konnte ein Signal bei ca. 65 kDa detektiert werden, was mit der theoretisch errechneten molekularen Masse des verkürzten E2-Proteins übereinstimmt. Die Signalstärke ist in allen Präparationen vergleichbar, was ungefähr gleich eingesetzte Proteinmengen im Aktivierungsexperiment bedeutet. Als Positivkontrolle für die Produktion von löslichen E2-Proteinen in der Western-Blot Entwicklung diente sH84. Dieses Protein enthält die ko-

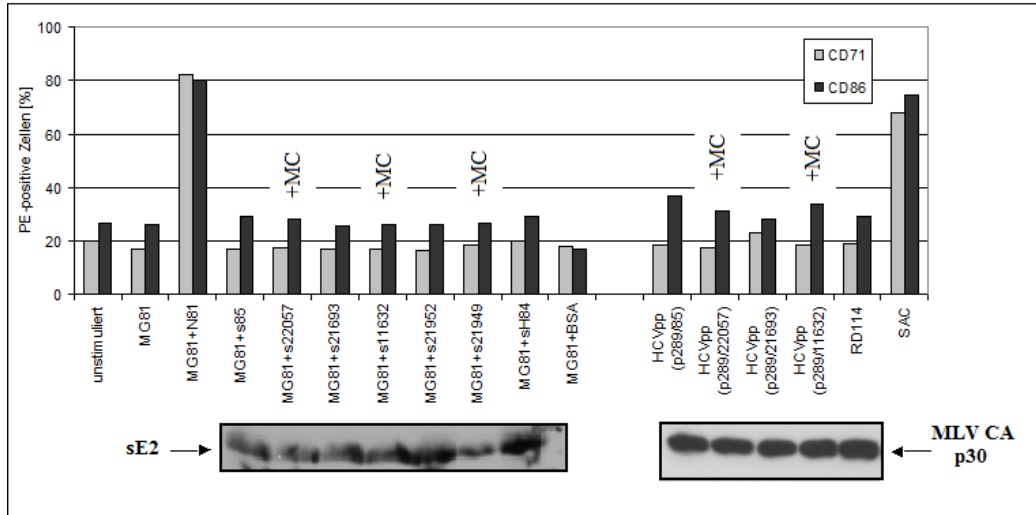


Abbildung 4.7: Aktivierungsstatus humaner B-Lymphozyten nach Stimulation mit löslichem E2 (sE2, $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) und HCVpp (100 μL). +MC: Kryoglobulinämie; MG81/N81: monoklonale anti-CD81 Antikörper; H84 : sE2-Kontrollprotein HCV-Stamm H77; Bovine serum albumin (BSA); *Feline leukemia virus*-Pseudopartikel (RD114); *Staphylococcus aureus* *cowan Type I* (SAC, $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$); Die sE2-Proteinkonzentrationen und die Zugabe von HCVpp wurden mittels Western-Blot kontrolliert und sind unterhalb der entsprechenden Säulen dargestellt. Links: Nachweis der sE2-Proteine; Rechts Nachweis des MLV-Capsids (p30)

dierende Sequenz des E2-Proteins des HCV-Stammes H77 mit der GenBank Nummer AF009606.

Die Stimulation der B-Zellen mit HCVpp führte zu keiner nennenswerten Zunahme der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Der Status der Aktivierungsmarker liegt nach Stimulation mit HCVpp bei durchschnittlich 19 % (CD71) und 32 % (CD86), was nur eine leichte Zunahme gegenüber dem Aktivierungsstatus der unstimulierten Zellen bedeutet (Abbildung 4.7 rechts). Aufgrund der bereits mit Huh7-Zellen gemessenen, niedrigen Infektionseffizienz der Genotyp 3 HCVpp (Abbildung 4.5), wurden nur die Genotyp 1 und 2 Pseudotypen für die Aktivierungsassays verwendet. Bei RD114 handelt es sich um Pseudotypen, welche mit den Hüllproteinen eines nicht-humanpathogenen Virus pseudotypisiert wurden und dienen der Kontrolle der HCV-Spezifität. Die eingesetzte HCVpp Konzentration wurde vor Zugabe zu den Zellen mittels Western Blot analysiert. Da keine E2-spezifischen Antikörper existieren, wurde mit einem p30-Antikörper die Intensität des MLV Core-Proteins überprüft und dieses als Normalisierungsmaß für die verwendete Pseudotypenmenge verwendet. Die MLV Menge

war in diesem Experiment in allen HCVpp Präparationen vergleichbar (siehe Ausschnitte in Abbildung 4.7).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur die Positivkontrolle SAC und die Kombination beider CD81-Antikörper MG81 und N81 eine Aktivierung von B-Lymphozyten bewirkt. Weder die Zugabe von löslichem E2 noch von HCVpp bewirkten eine signifikante Aktivierung, welche durch eine gegenüber der Basalaktivität erhöhten Fluoreszenzintensität gemessen werden konnte. Unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen konnten daher auch keine differentiellen, Kryoglobulinämie-abhängigen Stimulations-effekte erfasst werden. Die Ergebnisse konnten unabhängig mit PBMCs eines weiteren Probanden bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Gewinnung von nativen Hepatitis C Viren zur Stimulation von PBMCs

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit verwendeten Modellsystemen wie lösliche E2-Proteinpräparationen und HCVpp, wurden native HCV zur Stimulation der Lymphozyten verwendet. Diese wurden aus Seren von verschiedenen, mit HCV infizierten Patienten gewonnen unter denen sieben Kryoglobulinämie-positiv und vier Kryoglobulinämie-negativ waren. Die Viruspartikel wurden mit Hilfe eines selbstformenden Iodixanol Dichtegradienten entsprechend ihrer Dichte fraktioniert (siehe Abschnitt 3.3.4). In einem orientierenden Experiment wurden diejenigen Fraktionen mit der höchsten Viruskonzentration durch Messung der HCV-RNA Konzentration bestimmt und deren Dichte durch photometrische Messung der Iodixanol Absorption ermittelt. Die so erhaltenen Viruspartikel ließen sich einer berechneten Dichte von $1,03 \text{ g mL}^{-1}$ bis $1,05 \text{ g mL}^{-1}$ zuordnen (Abbildung 4.8). Aus diesen Fraktionen wurden die Partikel mit Hilfe eines Konzentrators (Viva Spin 20, Sigma-Aldrich), welcher mit einer 100 kDa Membran arbeitet, gesammelt. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der HCV-RNA Konzentration, um zur Stimulation von PBMCs gesunder Probanden Viruspartikel in einer Konzentration von 10000 IU mL^{-1} einzusetzen.

4.2.4 Untersuchung der IgM Antikörperproduktion nach Stimulation von PBMCs

Da sich die Kryoglobulinämie durch eine vermehrte IgM Antikörperproduktion auszeichnet (Dammacco et al., 2001), wurde die IgM Konzentration nach Stimulation von PBMCs gesunder Probanden als Parameter zur Untersuchung Kryoglobulinämie-bedingter Effekte benutzt. Die von den B-Lympho-

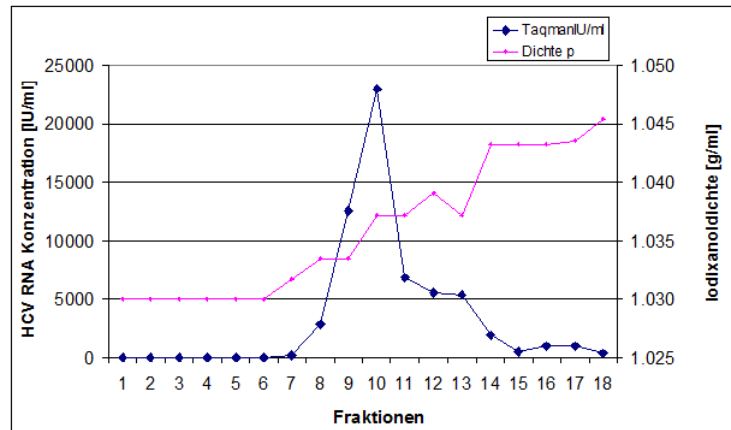


Abbildung 4.8: Isolation von HCV mittels Iodixanol Dichtegradienten. Die HCV-RNA-Konzentration der einzelnen Fraktionen wurde mittels Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan bestimmt. Die Dichte der Fraktionen wurde durch Messung der Absorption der Iodixanol-fraktion bei 244 nm bestimmt.

zyten sekretierte Menge an IgM Antikörpern wurde 10 Tage nach Stimulation mittels eines IgM ELISA bestimmt (siehe Abschnitt 3.6.3). Als stimulierenden Faktor wurden lösliche E2-Proteinen ($5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), HCVpp ($100 \mu\text{L}$) und native HCV-Viruspartikel (10000 IU ml^{-1}) eingesetzt. Berechnet wurden die relative Änderung der IgM Konzentration normalisiert bezüglich der basalen IgM Konzentration unbehandelter Zellen (Negativkontrolle). Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte von vier unabhängigen Versuchen und sind in den Abbildungen 4.9 und 4.10 zusammengefasst.

Die in Abbildung 4.9 dargestellte Stimulation der PBMCs mit löslichen HCV-E2-Proteinen erfolgte analog zu den in Abschnitt 4.2.2 durchgeführten Experimenten als kombinierte Zugabe von E2-Proteinen mit dem monoklonalen Antikörper MG81. Die relativen Änderungen der IgM Konzentration nach Stimulation mit den verschiedenen E2-Proteinen liegen in einem Bereich zwischen 5 und 44 %, während die Stimulation mit SAC (Positivkontrolle) zu einer relativen Änderung von 74 % führt. Da sowohl nach Stimulation mit MG81 alleine und mit MG81 in Gegenwart von BSA (Negativkontrollen), relative Änderungen der IgM Konzentrationen zwischen 34 % und 53 % detektierbar sind, kann eine HCV-spezifische Induktion der IgM Antikörperproduktion ausgeschlossen werden. Interessanterweise führt die CD81 vermittelte Stimulation der PBMCs unter kombinierter Verwendung der monoklonalen Anti-CD81 Antikörpern MG81 und N81 zu einer deutlichen Aktivierung der B-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2), wogegen in diesem Experiment eine Änderung der IgM Produktion von lediglich 24 % detektiert werden

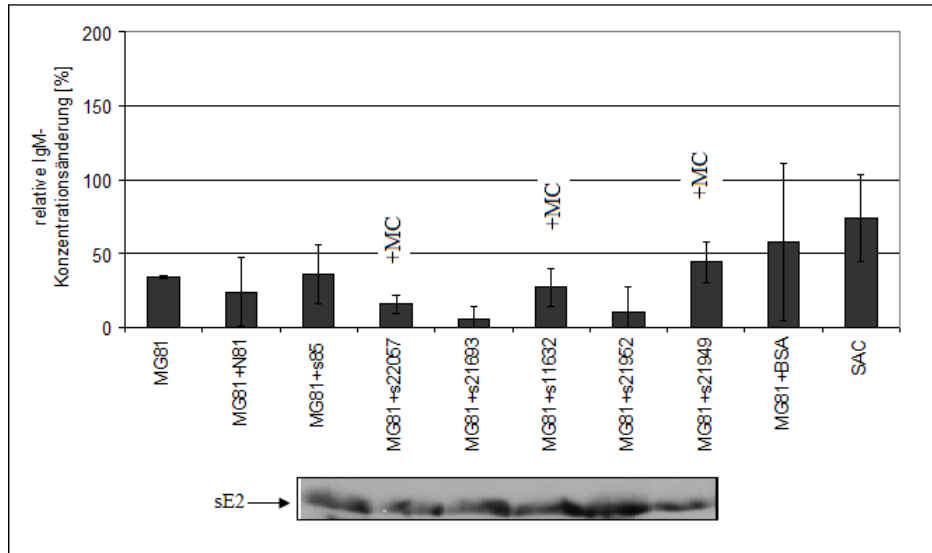


Abbildung 4.9: Produktion von IgM Antikörpern nach Stimulation mit löslichen E2-Proteinen (sE2, $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). +MC: Kryoglobulinämie; MG81/N81: monoklonale anti-CD81 Antikörper; Bovine serum albumin (BSA), Die sE2-Proteinkonzentrationen wurden mittels Western-Blot kontrolliert und sind unterhalb der entsprechenden Säulen dargestellt.

konnte.

Nach Stimulation der PBMCs durch die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten HCVpp konnten IgM Konzentrationsänderungen gemessen werden, die teilweise deutlich höher als die gemessenen 22 % Änderung durch HCVpp ohne Hüllproteine oder 26 % Änderung durch RD114 ausfielen (Abbildung 4.10). Die Stimulation mit p289/85, p289/11632 und p289/21949 HCVpp ergab relative Änderungen von 55 %, 96 % und 51 % wobei p289/11632 und p289/21949 HCVpp Hüllproteine besitzen, welche aus Kryoglobulinämie-positiven Seren isoliert wurden. Die Stimulation mit p289/22057, p289/21693 und p289/21952 HCVpp ergab keine erhöhte Änderungen der IgM Konzentration. Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen zum ersten Mal einen durch spezifische HCV-Viruskomponenten (Hüllprotein der HCVpp) verursachten Effekt auf die IgM Produktion von PBMCs.

Die Stimulation von PBMCs mit den in dieser Arbeit isolierten, nativen Viren (siehe Abschnitt 4.2.3) zeigte im Gegensatz zur Stimulation mit löslichen Proteinen, HCVpp oder SAC eine erheblich stärkere relative Änderung der IgM Konzentration mit Werten im Bereich zwischen 200 % und 1000 % (siehe Abbildung 4.11). Um den Hintergrund der Reaktion zu ermitteln wurden die Zellen entweder mit einer 5 % und einer 10 % Iodixanollösung oder

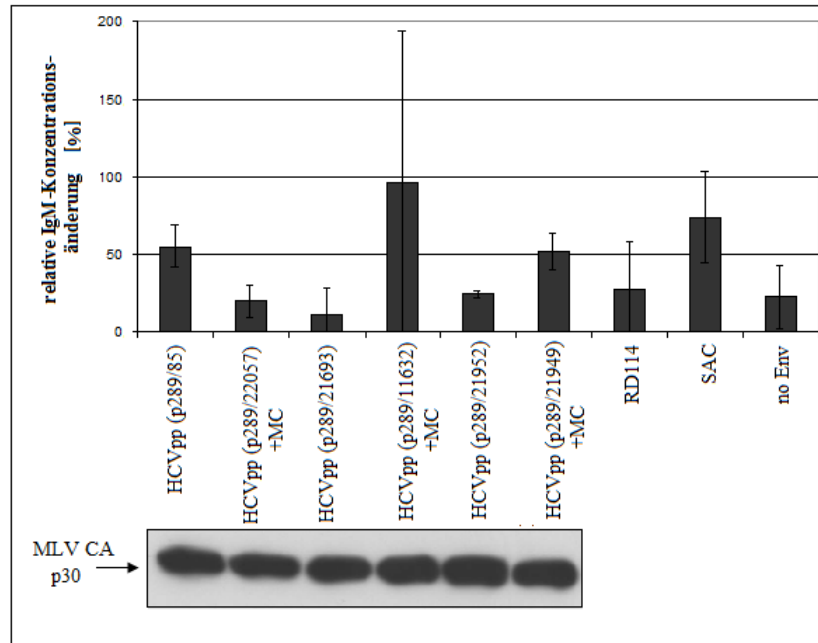


Abbildung 4.10: Produktion von IgM Antikörpern nach Stimulation mit HCVpp (HCVpp, 100 μ L); +MC: Kryoglobulinämie; *feline leukemia virus*-Pseudopartikel (RD114) ; NoEnv: MLV-Kapsid ohne Hüllproteine, Die Zugabe von HCVpp wurden durch Detektion des MLV-Capsids (p30) mittels Western-Blot kontrolliert und ist unterhalb der entsprechenden Säulen dargestellt.

mit HCV-negativem, humanem Serum inkubiert. In beiden Fällen konnte keine induzierende Wirkung auf die Antikörperproduktion detektiert werden. Die hier zur Stimulation verwendeten nativen Viren induzierten hingegen deutliche, HCV-spezifische IgM Konzentrationsänderungen. Diese konnten allerdings nicht auf das Vorhandensein einer Kryoglobulinämie zurückgeführt werden, da auch nach Stimulation mit Viren aus Kryoglobulinämie-negativen Seren eine vergleichbar starke IgM-Antikörperproduktion gemessen wurde (siehe Abbildung 4.11).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zum ersten Mal ein System etabliert worden ist, welches in der Lage ist, die durch HCVpp oder native HCV-Partikel induzierte Änderung der IgM Produktion von PBMCs zu erfassen. Dabei war die induzierende Wirkung von nativen HCV-Partikel durch eine massive Zunahme der IgM Konzentration um den Faktor 100 gekennzeichnet. Letztendlich konnte aber weder die Verwendung von HCVpp noch von nativen Viren einen eindeutigen Hinweis für einen Kryoglobulinämie-spezifischen Effekt liefern. Die Verwendung von löslichen E2-Proteinspezies

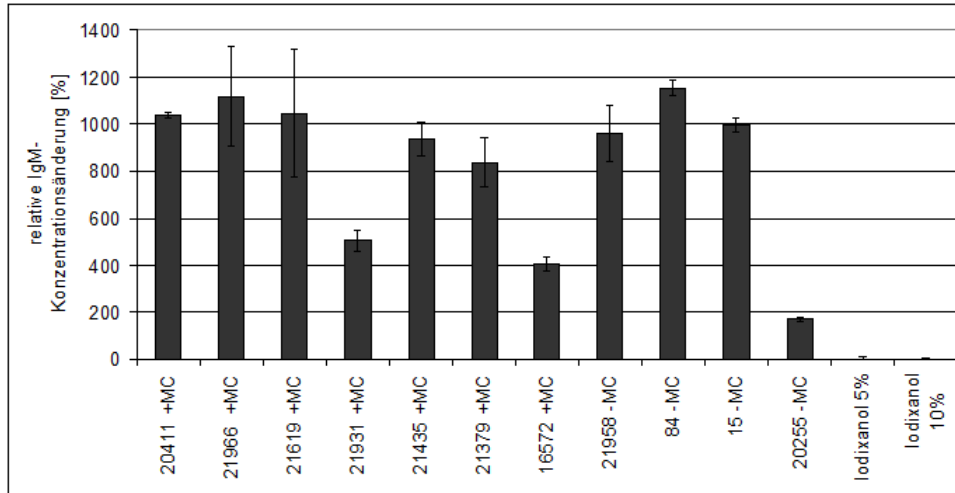


Abbildung 4.11: Produktion von IgM Antikörpern nach Stimulation mit nativen HCV; +MC = Kryoglobulinämie

führte zu keinen signifikanten Änderungen der IgM Konzentration, was deren Eignung im vorgestellten System ausschließt.

4.3 Pseudotypen als Modellsystem zur Untersuchung neutralisierender Antikörper

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden HCV-Pseudotypen als Modellsystem zur Untersuchung der Virusneutralisation durch Antikörper aus Patientenseren verwendet.

Durch das Fehlen einer 3'→5' Exonukleaseaktivität der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase des HCV kommt es zu einer hohen Mutationsfrequenz des HCV-Genoms, insbesondere innerhalb der HVR1, die als B-Zell-Epitop identifiziert wurde. Es wird vermutet, dass Mutationen innerhalb der HVR1 zur Veränderung des Epitops führen, die das Virus vor einer Neutralisierung durch Antikörper schützt. Diese sog. *Escape*-Mutanten könnten an der Entstehung der chronischen Hepatitis C beteiligt sein. Mit Hilfe von HCVpp kann die Bindung von Antikörpern unter Berücksichtigung von Veränderungen im Bereich der HVR1 untersucht werden, indem neutralisierende Antikörper an die Hüllproteine der HCVpp binden und den Viruseintritt inhibieren. Unter Verwendung von Huh7 als Zielzellen konnte die Abnahme des Anteils von infizierten Zellen an der Gesamtpopulation im Vergleich zu nicht neutralisierten HCVpp gemessen werden.

4.3.1 Entstehung von HVR1-Mutationen unter antivi-raler Therapie

Um eine mögliche Korrelation zwischen HVR1-Mutationen und Präsenz neu-tralisierender Antikörper zu zeigen, wurde beispielhaft die E1/E2-Sequenz eines Patienten, der trotz kurzzeitiger Viruselimination während der Thera-pie rückfällig wurde (*end of treatment relapse* = ETR-Patient), in das be-stehende HCVpp System (Genotyp 1b) eingebaut. Hierzu wurde die E1/E2-Quasispezies des ETR-Patienten vor Therapie (Basislinie), zu Therapiewoche (TW) 4, 8 und nach Therapieende (FU) sequenziert, analysiert und entspre-chende molekulare Veränderungen am bereits existierenden Genotyp 1 HCV-pp System vorgenommen. Als Kontrolle diente die HCV-Quasispezies eines Patienten, der weder vor, unter oder nach der Behandlungsperiode auf die Therapie ansprach (*non responder* = NR-Patient) (Tabelle 4.6).

Die HCV-Core_{c-Terminus}-E1/E2-Sequenzen beider Patienten wurden zu ver-schiedenen Therapiezeitpunkten mit Hilfe einer *semi-nested*-PCR und Geno-typ 1b-spezifischen Primern amplifiziert (siehe Abschnitt 3.2.5) und in den Topo-XL Vektor kloniert (siehe Abschnitt 3.2.10). Anhand von mehreren Klonen wurde jeweils eine Konsensussequenz zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet (Tabelle 4.6). Die Konsensussequenzen wurden mit der jeweiligen Basisliniensequenz verglichen, wobei beim ETR-Patienten die Aminosäure-sequenz der Hüllproteine im Laufe der Therapie konserviert blieb und Mu-tationen ausschließlich innerhalb der HVR1 vorkamen. Im Folgenden ist ein Ausschnitt der E2-HVR1-Sequenz des ETR-Patienten gezeigt. Auf der linken

Tabelle 4.6: Im Rahmen der Untersuchung von neutralisierenden HCV-Antikörpern gene-rierte E1/E2-Klone.

Gt ¹	Patient	Serumnummer	Therapiezeitpunkt (Abkürzung)	Plasmidname
1b	ETR ²	085	Basislinie (Bl)	pTopo/085kon
		151	Woche 4 (TW4)	pTopo/151kon
		210	Woche 8 (TW8)	pTopo/210kon
		318	Woche 18 (TW18)	pTopo/318kon
		439	24 Wochen nach Ende (FU24)	pTopo/439kon
1b	NR ³	1109	Basislinie (Bl)	pTopo/1109kon
		1583	Woche 18 (TW18)	pTopo/1583kon
		3195	24 Wochen nach Ende (FU24)	pTopo/3195kon

1: *Genotyp*

2: *end-of-treatment relapse*

3: *non-responder*

Seite sind Serumnummer, welche der Konsensussequenz zugrunde liegt, sowie Zeitpunkte der Serum-Entnahme gekennzeichnet (siehe hierzu auch Tabelle 4.6).

ETR-Patient		310	320	330	340	350	360
	
(085kon)	B1	MMNWSPTTAI	VVSQLLRIPQ	AIMDMVAGAH	WGVLAGLAYY	SMVGNWAKVL	IVMLLFAGVD
(151kon)	TW4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(210kon)	TW8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(318kon)	TW18	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(439kon)	FU24	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		----->E2					
		370	380	390	400	410	420
	
(085kon)	B1	GSTYVTGGSQ	AYTTRGLTSL	FSLGSQKQVQ	LVNTNGSWHI	NRTALNCNDS	LQTGFLLAALF
(151kon)	TW4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(151kon)	TW8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(318kon)	TW18	-----	-H-----A-	-----	-----	-----	-----
(439kon)	FU24	-----	-H-A-----	-----	-----	-----	-----
		<-----HVR1----->					
		430	440	450	460	470	480
	
(085kon)	B1	YTHRFNSSGC	PERMASCRPI	DEFAQGWGPI	TYDESGGSDQ	KPYCWHYAPR	PCGIVPASQV
(151kon)	TW4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(151kon)	TW8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(318kon)	TW18	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(439kon)	FU24	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Innerhalb der HVR1 haben folgende Mutationen stattgefunden: zu Therapiewoche 18 und nach Beendigung der Therapie taucht ein Virusstamm auf, bei dem an Position 372 ein Tyrosin zu einem Histidin (T372H) und an Position 378 ein Threonin zu einem Alanin (T378A) entstanden sind. Nach Beendigung der Therapie konnte T372H noch nachgewiesen werden, T378A war allerdings wieder zur Basisliniensequenz revertiert und eine neue T378A Mutation ist entstanden.

Die HCV-Sequenzen des NR-Patienten sind, wie folgender Sequenzvergleich zeigt, im Vergleich zum ETR-Patienten etwas heterogener. Außerhalb der HVR1 entwickelt das Virus zu Therapiewoche 18 sechs Mutationen, wobei nur drei dieser Mutationen auch nach Therapie noch erhalten sind. Innerhalb der HVR1 ist das Virus im Therapieverlauf an 4 Positionen mutiert: S373A, Q376R, Y379S und G380T. Nach Beendigung der Therapie ist das Virus mit Ausnahme von G380R zur Basisliniensequenz revertiert.

NR-Patient		310	320	330	340	350	360
	
(1109kon)	BL	AWDMMNWS	TTALVVAQLL	RVPQAIDMI	AGAHWGVLAG	IAYFSMVGW	AKVLVVLLLF
(1583kon)	TW18	-----	-----	-----	-----	-----	-----
(3195kon)	FU24	-----	-----	-----	-----	-----	-----

```

|----->E2
          370      380      390      400      410      420
(1109kon) BL AGVDATHTTT GGSAAQATYG LASFFSPGAK QNIQLINTNG SWHINRTALN CNASLDTGWV
(1583kon) TW18 ----- --A--R--ST -----
(3195kon) FU24 ----- --R----- -D-----
|<-----HVR1----->|

          430      440      450      460      470      480
(1109kon) BL AGLFYKFFNF SSGCPERMA CRPLADFDQG WGPISYANGT GPEHRPYCWH YPPKPCGIVP
(1583kon) TW18 -----H-----L-----
(3195kon) FU24 -----

```

4.3.2 Konstruktion der Expressionsvektoren zur Herstellung von Pseudotypen mit HVR1-Mutationen

Die amplifizierte Basislinien HCV-Core_{c-Terminus}-E1/E2-Konsensussequenz des ETR-Patienten wurde in den Expressionsvektor p289 kloniert (p289/85, siehe Abschnitt 4.1.2) von dem ausgehend alle HVR1-Mutanten generiert worden sind. Aufgrund der konservierten Sequenz außerhalb der HVR1, konnte die HVR1-Sequenz des Plasmids p289/85 mittels BspE1 durch die HVR1-Sequenzen der Plasmide pTopo/318kon und pTopo/439kon ausgetauscht werden. Die korrekte Orientierung der HVR1-Fragmente wurde durch eine SalI Restriktionsanalyse und die eingebauten Mutationen durch Sequenzierung der HVR1 bestätigt. Die neu generierten Expressionsvektoren wurden p289/85, p289/318 und p289/439 genannt (Tabelle 4.7).

Die amplifizierte Core_{c-Terminus}-E1/E2-Konsensussequenz des NR-Patienten zum Basislinien-Zeitpunkt wurde in den Expressionsvektor p289 kloniert (p289/1109). Der Austausch der HVR1-Sequenz des Plasmids p289/1109 durch die HVR1-Sequenzen der Plasmide pTopo/1583kon und pTopo/3195kon er-

Tabelle 4.7: Seren zur Analyse von HVRI-Mutationen unter Interferon-Therapie

	Serumnr.	Therapiestatus	HVRI-Mutationen	Vektor
ETR-Patient	85	Vor Therapie	–	p289/85
	151	Therapiewoche 4	–	–
	210	Therapiewoche 8	–	–
	318	Therapiewoche 18	T372H; T378A	p289/318
	439	nach Therapie	T372H; T378A	p289/439
NR-Patient	1109	Vor Therapie	–	p289/1109
	1583	Therapiewoche 18	S373A; Q376R; Y379S; G380T	p289/1583
	3195	nach Therapie	G380R	p289/3195

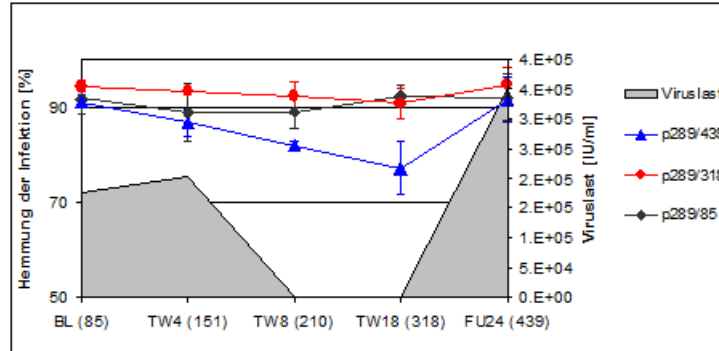
folgte mittels der Restriktionsenzyme NruI und BclII. Die Mutationen außerhalb der HVR1 (siehe Abschnitt 4.3.1) wurden hierbei nicht berücksichtigt, damit mögliche Effekte ausschließlich auf Veränderungen innerhalb der HVR1 zurückzuführen sind. Der Austausch der HVR1-Sequenzen wurde durch Sequenzierung bestätigt. Im Folgenden wurden die neu generierten Expressionsvektoren zur Produktion von HCVpp verwendet.

4.3.3 Neutralisierung von Pseudotypen mit Therapie induzierten HVR1-Mutationen

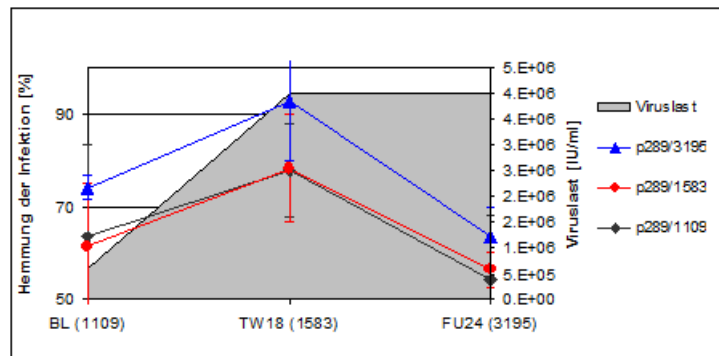
Zur Untersuchung des Virus-*Escape* und des damit verbundenem Wiederanstiegs der Viruslast wurden HCVpp generiert, welche die während der Therapie entwickelten HVR1-Mutationen tragen. Als Kontrolle wurden Pseudotypen mit Hüllproteinen eines NR-Patienten verwendet bei denen keine Bildung neutralisierender Antikörper im Therapieverlauf erwartet wurde. Die HCVpp Varianten beider Patienten wurden vor Infektion der Huh7-Zellen mit den verschiedenen Patientenseren behandelt (siehe Abschnitt 3.3.3). Der Anteil der infizierten Zellen wurde 48 Stunden nach Infektion cytometrisch gemessen (siehe Abschnitt 3.4.5) und ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Die Ergebnisse sind auf die HVCpp Infektiösität nach Behandlung mit HCV-negativem Serum normiert.

In Abbildung 4.12a ist die Hemmung der Infektion von HCVpp durch neutralisierende Antikörper, deren Hüllproteine auf Grundlage der Quasispezies des ETR-Patienten konstruiert wurden, gezeigt. Die Hemmung der Infektion von HCVpp mit Hüllproteinen der Basislinie (p289/85) nahm tendenziell bis zur Therapiewoche 4 ab, um danach wieder anzusteigen. In dem Serum der Therapiewoche 18 (318) und dem Serum nach Therapie (439) wurde eine 90 % bzw. 91 % Infektionsinhibierung gemessen. Zwischen der Therapiewoche 4 und 8 wurde gleichzeitig ein Abfall der Viruslast bis unter die Nachweisgrenze gemessen, was auf ein gutes Ansprechen auf die Interferon-Therapie hinweist. Zu Therapiewoche 18 und nach Therapie haben sich bereits Virusstämme mit HVR1-Mutationen etabliert (p289/318 und p289/439), deren Infektion zum jeweiligen Entstehungszeitpunkt mit ca. 90 % inhibiert wurde. Interessanterweise waren auch in den Seren, welche vor Entstehung der HVR1-Mutationen gesammelt wurden, bereits Antikörper vorhanden, die die Infektion von HCVpp mit einer später entstandenen HVR1 inhibierten. Nach Beendigung der Therapie nahm zwar die Inhibierung der HCVpp Infektiösität bei allen Varianten zu, jedoch auch die Viruslast. Somit zeigte sich kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Viruslast und Virusneutralisierung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in allen Seren zu den verschie-



(a)



(b)

Abbildung 4.12: Untersuchung der Neutralisation von HCVpp mit HVR1-Mutationen. HCVpp mit HVR1-Mutationen eines ETR-Patienten (a) und HCVpp mit HVR1-Mutationen eines NR-Patienten (b) werden zu verschiedenen Zeitpunkten unter Interferon-Therapie auf das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern untersucht.

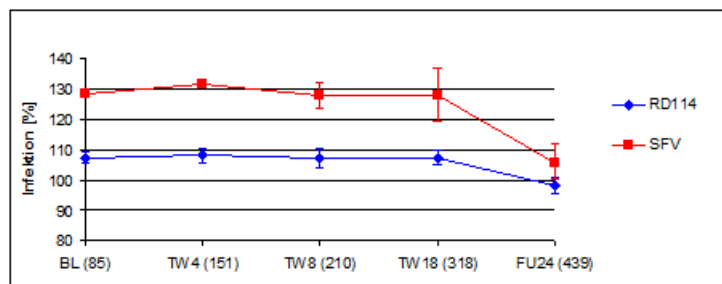
denen Therapiezeitpunkten Antikörper vorhanden waren, die eine Infektion mit Pseudotypen zwischen 77 und 95 % inhibierten, unabhängig davon ob eine HVR1-Mutation vorlag. Betrachtet man den dazugehörigen Verlauf der Viruslast, so fällt auf, dass der starke Anstieg der Viruslast nach Therapie von einer vorhergehenden Abschwächung der Neutralisierung zu Therapiewoche 18 begleitet ist, was als möglicher Effekt eines Virus-*Escapes* interpretiert werden könnte.

In Abbildung 4.12b ist die Hemmung der Infektion von HCVpp durch neutralisierende Antikörper, deren Hüllproteine auf Grundlage der Quasispezies des NR-Patienten konstruiert wurden, gezeigt. Verglichen mit dem ETR-Patienten fällt die bereits zur Basislinie erheblich höhere Viruslast des NR-Patienten auf. Zusätzlich war die Hemmung der Infektion durch Anti-

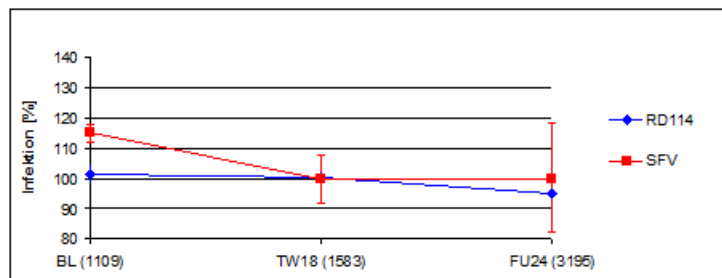
körper mit durchschnittlich 70 % im Vergleich zum ETR-Patienten mit einer durchschnittlichen Infektionshemmung von 90 % deutlich geringer. Zu Therapiebeginn lag die Infektionsinhibierung von HCVpp mit Hüllproteinen der Basislinie (p289/1109) bei 63 %. Zur Therapiewoche 18 konnte eine Zunahme der Inhibierung gegenüber der Basislinie beobachtet werden, die fast dieselben Werte aufwies wie die Inhibierung der in der Zwischenzeit entstandene HVR1 Variante (p289/1583). Nach Therapie sank die Inhibierung der Infektiösität von HCVpp mit Basislinien-Hüllproteinen wieder bis auf 54 % ab. Eine nach Beendigung der Therapie gefundene HVR1 Variante (p289/3195) wurde zu diesem Zeitpunkt nur zu ca. 65 % inhibiert, während diese zu einem früheren Zeitpunkt vor Entstehung seiner Konsensus HVR1-Sequenz bereits zu 92 % inhibiert wurde. Auch hier konnten also HCVpp durch Seren, die vor Entstehen der jeweiligen Mutationen gesammelt wurden, neutralisiert werden.

Zusammenfassend kann anhand des untersuchten NR-Patienten kein direkter Zusammenhang zwischen Virusneutralisierung basierend auf der Entstehung von Mutationen im Bereich der HVR1 und der Viruslast im Therapieverlauf festgestellt werden. Verglichen mit dem untersuchten ETR-Patienten wurde jedoch eine generell schwächere Neutralisierung durch Antikörper gemessen, was möglicherweise auch zur Erhaltung der hohen Viruslast beiträgt.

Zur Kontrolle der HCV-Spezifität der neutralisierenden Antikörper wurden RD114pp (feline leukemia virus) und SFVpp (semliki forest virus) parallel mit den gleichen Seren behandelt. Bei beiden Kontrollen handelt es sich um Hüllproteine von nicht-humanpathogenen Viren. In Abbildung 4.13 ist die Infektiösität der Kontrollpartikel, normiert auf die Infektiösität von Partikeln, welche mit HCV-negativem Serum behandelt wurden, gezeigt. Sowohl nach Behandlung der Pseudotypen mit Seren des ETR-Patienten (Abbildung a) als auch mit Seren des NR-Patienten (Abbildung b) liegt die Infektionsrate bei über 100 %. Eine Ausnahme besteht bei RD114pp. Hier beträgt die Infektion im Serum 3195 nur 95 %. Demzufolge beruhen die in Abbildung 4.12a und 4.12b dargestellten Hemmungen der HCVpp auf der Bindung von HCV-spezifischen Antikörpern.



(a)



(b)

Abbildung 4.13: Untersuchung der HCV-Spezifität von neutralisierenden Antikörpern in Seren eines ETR-Patienten (a) und in Seren eines NR-Patienten (b) durch Verwendung von Pseudotypen mit nicht humanpathogenen Hüllproteinen.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 HCV-Pseudotypen

Die chronische HCV-Infektion stellt weltweit und insbesondere in den Industrienationen eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer Leberzirrhose und eines Leberzellkarzinom dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation sind ca. 200 Millionen Menschen weltweit mit HCV infiziert, was ein globales Gesundheitsproblem darstellt. Nach heutigem Stand der Forschung erfolgt der Eintritt der Viruspartikel in die Zellen durch die Bindung über die viralen Hüllproteine E1 und E2 an zelluläre Oberflächenrezeptoren. Verschiedene zelluläre Rezeptoren wie z.B. CD81 (Pileri et al., 1998), SR-B1 (Scarselli et al., 2002) CLDN1, CLDN6, CLDN9 (Evans et al., 2007; Zheng et al., 2007) und der Occludin-Rezeptor (Ploss et al., 2009) wurden als Interaktionspartner des HCV beschrieben, wobei CD81 der am besten untersuchte Bindungspartner des HCV darstellt (siehe Abschnitt 2.3). Einen Durchbruch für die Erforschung der zellulären Aufnahme von HCV stellt die kürzliche Entwicklung von HCV-Pseudotypen dar (Bartosch et al., 2003b; Hsu et al., 2003). Da mit Zellkultursystemen, welche infektiöse HCV-Partikeln produzieren, nur unter strengen Sicherheitsvorkehrungen gearbeitet werden darf, stellen Pseudotypen ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Interaktion zwischen Zielzelle und Hüllproteinen dar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, klinisch charakterisierte Pseudotypen herzustellen, um damit die mögliche Korrelationen zwischen klinischen Befunden und Virus-Zell Interaktion untersuchen zu können.

5.1.1 Expression von E1/E2-Proteinen und funktionale HCV-Pseudotypen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus verschiedenen Patientenseren HCV-E1/E2 kodierende Sequenzen zur Konstruktion von HCV-Pseudotypen verwendet. Die Auswahl der zur Pseudotypisierung verwendeten E1/E2-Sequenzen scheint ein kritischer Schritt bei der Herstellung von HCV-Pseudotypen zu sein. Eine wichtige Voraussetzung zur Produktion infektiöser Partikel, stellt die korrekte posttranslationale Modifizierung sowie die Inkorporation und Exposition der Hüllproteine auf der Partikeloberfläche dar. In einer Studie wurden aus 88 chronisch infizierten HCV-Patienten die E1/E2-Sequenzen amplifiziert und in Expressionsvektoren kloniert, wovon lediglich 24 die Herstellung funktionaler Pseudotypen ermöglichten (Lavillette et al., 2005). Dies spricht dafür, dass bei Verwendung einer einzigen Sequenz eines Patienten eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht keine funktionalen Hüllproteine zu erhalten. Um dies zu vermeiden, wurde ausgehend von fünf sequenziierten E1/E2-Klonen eine Konsensussequenz berechnet und anschließend durch ortsgerichtete Mutagenese in den entsprechenden Expressionsplasmiden hergestellt (siehe Abschnitt 3.2.6).

Da sich während der HCV-Morphogenese E1/E2-Proteine im Lumen des ER befinden und Core-Proteine im Zytosol, könnte in Abwesenheit von Core oder anderen rekrutierenden Nucleokapsid-Bildnern ein Verbleib oder möglicherweise ein Transport von E1/E2 zur Plasmamembran erfolgen, wobei die Proteine nicht auf der Partikeloberfläche exponiert werden. Die Detektion von E1/E2 auf der Zelloberfläche der Produzentenzellen kann daher als ein wichtiger Hinweis auf einen korrekten topologischen Einbau in die ER Membran angesehen werden. Mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Expressionsplasmiden konnte erfolgreich die Exposition von E1/E2 auf 293T-Zellen immunologisch nachgewiesen werden (Abbildung 4.2). Der hierbei in allen Fällen erhaltene hohe Anteil von mindestens 45 % an fluoreszierenden Zellen zeigt, dass die mittels der Konsensussequenz hergestellten E1/E2-Proteine aus sechs verschiedenen Patienten mit hoher Zuverlässigkeit exprimiert und auf der Zelloberfläche der Produzentenzellen präsentiert werden (Abbildung 4.2).

Nachdem die Topologie der durch die Konsensussequenz kodierten E1/E2-Proteine nachgewiesen worden ist, wurden die E1/E2-Expressionsplasmide zur Pseudotypisierung verwendet (siehe Abschnitt 4.1.4). Die so erhaltenen HCV-Pseudotypen wurden isoliert und ihre Infektiosität in einem initialen Infektionsexperiment überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass sämtliche in dieser Arbeit konstruierten Plasmide erfolgreich zur Herstellung funktionaler Pseudotypen verwendet werden konnten (Abbildung 4.1.4). Allerdings

zeigten sich auch auffallende Unterschiede in der Infektiösität, vor allem zwischen Genotyp 1 und Genotyp 2 HCV-Pseudotypen auf der einen Seite und Genotyp 3 HCV-Pseudotypen auf der anderen Seite.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von Lavillette et al. (2005) weisen die hier erhaltenen Ergebnisse eine Infektiösität bei allen sechs konstruierten HCV-Pseudotyp Varianten nach. Dies könnte für die Berechnung einer Konsensussequenz als eine ratsame Vorgehensweise bei der Herstellung klinisch charakterisierter HCV-Pseudotypen sprechen, da hierdurch die Wahrscheinlichkeit funktionale Hüllproteine zu erhalten, erhöht ist.

5.1.2 Unterschiedliche HCV-Genotypen unterscheiden sich in ihrer Infektiösität

Der initiale Vergleich der HCV-Pseudotyp Infektiösitäten verschiedener Genotypen zeigte deutliche Unterschiede (Abbildung 4.1.4). Pseudotypen, welche mit Hüllproteinen des Genotyps 2 pseudotypisiert wurden, zeigten mit über 10 % infizierten Zellen die höchste Infektiösität, während Genotyp 3 HCV-Pseudotypen mit ca. 2.5 % infizierten Zellen die geringsten Werte aufwiesen. Eine geringe Infektiösität von Genotyp 3 HCV-Pseudotypen verglichen mit HCV-Pseudotypen anderer Genotypen wurde bereits beschrieben (Lavillette et al., 2005), wobei die Gründe für das unterschiedliche Verhalten bisher nicht aufgeklärt worden sind. Es ist lediglich bekannt, dass bei der akuten und chronischen HCV-Infektion die Genotyp 2 und Genotyp 3 basierten Infektionen bessere Heilungschancen aufweisen (Mangia et al., 2005; Pawlotsky, 2003b). In einer kürzlich erschienenen Studie wurden mit Hilfe des infektiösen vollständigen HCV-Zellkultursystems Genotyp-spezifische Effekte hinsichtlich Infektiösität, Rezeptor-Interaktion, Bindung von neutralisierenden Antikörpern, Wechselwirkung mit Lipiden und die antivirale Wirkung von Interferon α -2b untersucht. Bei dieser umfangreichen Analyse der HCV Genotypen 1 bis 7 wurden keine wesentlichen Unterschiede bei der Infektiösität, der Interaktion mit den Rezeptoren CD81 und SR-BI, sowie bei Wechselwirkungen mit Lipiden oder der Behandlung mit Interferon α -2b gefunden. Die Bindung von neutralisierenden Antikörpern aus verschiedenen Patientenseren hingegen führten bei Viren des Genotyps 4a, 5a, 6a und 7a zu einer hohen Inhibierungsrate und einer etwas geringeren Rate für Viren des Genotyps 1a, 1b und 2b. Viren des Genotyps 2a und 3a wurden jedoch nicht von neutralisierenden Antikörpern aus den verschiedenen Patientenseren gebunden (Gottwein et al., 2009).

Die im oberen Abschnitt erwähnten Expositionsexperimente exprimierter E1/E2-Varianten auf der Plasmamembran der Produzentenzellen (Ab-

bildung 4.2) ergaben zwar auch Genotyp-spezifische Unterschiede, jedoch kann keine Korrelation zu den gemessenen Infektiösitäten hergestellt werden. Die Schwierigkeit diese Diskrepanz zu analysieren, liegt am geringen Anteil der gemeinsamen Prozesse (z.B. kotranslationale Translokation oder E1/E2-Proteinfaltung), welche zu den gemessenen Endpunkten Exposition oder Infektion führen. Zum Beispiel impliziert die Messung der Infektiösität weitere Voraussetzungen, wie HCV-Pseudotypen Morphogenese, Stabilität der HCV-Pseudotypen außerhalb der 293T-Zellen, Interaktionsunterschiede mit Huh7-Zellen und andere Prozesse, die im Falle der Protein-Exposition auf der Zelloberfläche nicht erfüllt werden müssen. Dies kann dazu führen, dass obwohl Genotyp 3 Hüllproteine z.B. stärker auf der Zelloberfläche exprimiert werden als Genotyp 2-Proteine, Genotyp 3 HCV-Pseudotypen eine deutlich schwächere Infektiösität als Genotyp 2 HCV-Pseudotypen aufweisen.

5.1.3 Humanes Serum steigert die Infektiösität von HCV-Pseudotypen

Neben der durch Rezeptoren vermittelten Virusinfektion wurde für HIV und das Ebola Virus eine Interaktion mit virusspezifischen Antikörpern und Proteinen des Komplement-Systems identifiziert, die *in vivo* und *in vitro* zu einer Verstärkung der Infektiösität dieser Viren führt (Füst, 1997; Takada and Kawakita, 2003). Auch für HCV ist eine Assoziation mit Serumbestandteilen wie z.B. VLDL (*very low density lipoproteins*), LDL (*low density lipoproteins*) und HDL (*high density lipoproteins*) bekannt (Agnello et al., 1999; Hijikata et al., 1993b; Kanto et al., 1994; Monazahian et al., 2000; Pumeechokchai et al., 2002; Thomssen et al., 1992). Ob die Bindung von Immunglobulinen und Lipoproteinen an HCV deren Infektiösität beeinträchtigen ist bislang unklar. In diesem Zusammenhang konnte jedoch gezeigt werden, dass die Infektiösität von HCV-Pseudotypen circa 10-fach gesteigert werden kann, wenn dem Medium der Produktionszellen humanes Serum zugegeben wird (Bartosch et al., 2005). Allerdings geschieht dies nicht, wie für HIV und das Ebola-Virus gezeigt, durch Antikörper oder Proteine des Komplement-Systems, sondern durch die Assoziation des HCV mit HDL (Bartosch et al., 2005). Demzufolge könnten humane Serumbestandteile gegenüber Rinderserum, das standardmäßig für Zellkulturmedien verwendet wird, für die Infektiösität der Pseudopartikel eine wichtige Rolle spielen.

Um mit den in dieser Arbeit produzierten Pseudotypen verbesserte Infektionsbedingungen für Huh7-Zellen zu erzielen, wurde der Einfluss von humanem Serum im Vergleich zu Rinderserum getestet. Hierbei wurde zwischen der Zugabe des Serums während der Pseudotypenproduktion und der

Zugabe des Serums während der Infektionsphase von Huh7-Zellen differenziert (Abbildung 4.5 und 4.6). Dabei wurde gezeigt, dass die Infektiosität der HCV-Pseudotypen durch Zugabe von humanem Serum während der Infektion der Huh7-Zellen um durchschnittlich 4,5 Prozentpunkte gesteigert werden kann. Demgegenüber führt die Substitution von FCS durch humanes Serum während der HCV-Pseudotypenproduktion nicht überzeugend zu einer Steigerung der Infektiosität (vergleiche Abbildung 4.5 a mit 4.5 b). Die einzige deutliche Steigerung konnte bei einem Genotyp 1-abgeleiteten HCV-Pseudotypen (Serum 85) gemessen werden. Es erscheint daher wahrscheinlicher, dass die humanen Serumlipide direkt an der Fusion von Pseudotypen mit der Zielzelle beteiligt sind. Da HDL als infektionssteigernde Komponente des humanen Serums identifiziert wurde, sind folgende Mechanismen für die vermehrte Virusaufnahme in Huh7-Zellen denkbar. Durch Assoziation des HCV mit HDL wird möglicherweise die Interaktion zwischen dem Lipoproteinrezeptor SR-B1, der ebenfalls als Korezeptor für HCV beschrieben wurde (Scarselli et al., 2002), und den HCV-Hüllproteinen stimuliert, was in einer verstärkten Virusaufnahme resultieren könnte. Alternativ ist denkbar, dass durch eine verstärkte Rezeptor-vermittelte Lipidaufnahme der Cholesterinanteil der Membran der Zielzellen erhöht wird, was zu einer erhöhten Infektiosität der HCV-Partikel führen könnte (Rigotti et al., 2003). Ein analoger Mechanismus wurde bereits für HIV oder Influenzaviren beschrieben (Chazal and Gerlier, 2003; Rawat et al., 2003).

Neben dem untersuchten Einfluss von humanem Serum konnte eine Steigerung der Infektiosität von HCV-Pseudotypen auch durch eine der Infektion nachgeschaltete Zentrifugation der Zielzellen erreicht werden. Die Gründe für diesen Effekt können momentan nicht erklärt werden. Durch die geringen Kräfte, die sich bei einer Zentrifugation mit 1000 g entstehen, lässt sich jedoch ein durch das Zentripetalfeld vermittelter Eintritt der HCV-Pseudotypen in die Zellen ausschließen.

5.2 HCV-assoziierte Kryoglobulinämie

Neben der zur chronischen Hepatitis C führenden Infektion von Leberzellen wird auch der Befall von Lymphozyten diskutiert, welcher für die Entwicklung lymphoproliferativer Erkrankungen wie z.B. der Kryoglobulinämie verantwortlich gemacht wird. Bei 80 % bis 90 % der Patienten mit Kryoglobulinämie Typ II liegt eine chronische HCV Infektion vor. Die Typ II Kryoglobulinämie ist eine Erkrankung, bei der vermehrt unspezifische polyclonale IgG und monoklonale IgM Antikörper gebildet werden, die durch Ablagerung in den Gefäßen zu einer Vielzahl von klinischen Symptomen füh-

ren können (Agnello et al., 1992; Ferri et al., 1991; Misiani et al., 1992). Eine Infektion mit dem Hepatitis B Virus verursacht hingegen weniger als 5 % Kryoglobulinämie Fälle (Ferri et al., 1998), was eine Beteiligung von HCV-spezifischen Effekten an der Krankheitsentwicklung untermauert. Der molekulare Mechanismus der durch HCV-induzierten Kryoglobulinämie ist bislang unklar. In einigen Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen der HVR1 und der Entstehung der Kryoglobulinämie beobachtet. Des weiteren wird entweder eine direkte Infektion oder eine Antigen-induzierte Stimulation der B-Lymphozyten vermutet. Um die vorgeschlagenen Mechanismen näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit klinisch charakterisierte HCV-Pseudotypen und lösliche E2-Proteine als Modellsysteme eingesetzt.

5.2.1 HCV-assoziierte Kryoglobulinämie und die Rolle der HVR1

Wie andere RNA Viren zirkuliert auch HCV im Patienten als eine heterogene Population eng verwandter Virusvarianten, der sog. Quasispezies. Da die HVR1 als Bereich größerer Variabilität bekannt ist (Kato et al., 1992; Weiner et al., 1991) und das E2-Protein als B-Zellepitop identifiziert wurde (Isaguliantis et al., 2002; Nakamoto et al., 1996; Scarselli et al., 1995; Sekiya et al., 1994), wird ein Zusammenhang zwischen der HVR1-Sequenz und der Entwicklung einer Kryoglobulinämie vermutet. In diesem Zusammenhang wurden HVR1-Sequenzen von chronisch infizierten Patienten mit und ohne Kryoglobulinämie untersucht, wobei in 6 von 21 Fällen eine Insertion an Position 385 und eine Deletion an Position 384 mit dem Vorhandensein einer Kryoglobulinämie assoziiert werden konnte (Gerotto et al., 2001). Zwei kürzlich erschienene Arbeiten zeigen hingegen, dass Insertionen an Position 385 nicht mit dem Vorhandensein einer Kryoglobulinämie korrelierbar sind (Bianchettin et al., 2007; Rigolet et al., 2005). Durch mathematische Analyse von experimentellen Kryoprecipitationen und HVR1-, HVR2- und CD81-bindenden Sequenzen des E2-Proteins wurden Mutationen an den Positionen 389 und 398 mit der Entwicklung einer Kryoglobulinämie korreliert (Hofmann et al., 2004). Die in dieser Arbeit generierten Konsensussequenzen aus Kryoglobulinämie betroffenen Patienten wiesen weder Insertionen noch Deletionen auf, was sich mit den Beobachtungen von Rigolet et al. (2005) und Bianchettin et al. (2007) deckt. Weiterhin konnte kein Aminosäureaustausch an den Positionen 389 und 398 mit dem Auftreten einer Kryoglobulinämie assoziiert werden. Auffällig war hingegen, dass das Vorhandensein der Kryoglobulinämie trotz unterschiedlicher Geno- und Subtyp-Klassifizierung möglicherweise mit einer höheren Sequenzähnlichkeit assoziiert ist. Beim Ver-

gleich der E1/E2-Gesamtsequenzen konnten interessanterweise keine nennenswerten Homologieunterschiede zwischen den Kryoglobulinämie-positiven und Kryoglobulinämie-negativen Gruppen, verglichen mit den Sequenzen ohne Rücksicht auf Vorhandensein von Kryoglobulinämie, festgestellt werden (Abbildung 4.3 und 4.4). Dies könnte ein erster statistischer Hinweis auf einen möglichen Einfluss der HVR1-Sequenz auf die Entstehung einer Kryoglobulinämie liefern, was im Laufe der weiteren Arbeit mit experimentellen Daten näher untersucht wird.

5.2.2 Infektion von B-Lymphozyten mit HCV-Pseudotypen

Obwohl die Infektion von Lymphozyten bislang umstritten ist, konnte gezeigt werden, dass bei der Mehrzahl von HCV infizierten Patienten naive B-Zellen aktiviert sind (Rosa et al., 2005). Weiterhin konnte ein Abklingen der Aktivierung nach Viruselimination durch eine Interferon-Therapie gezeigt werden (Rosa et al., 2005). Anhaltspunkte für eine direkte Infektion und eine extrahepatische Replikation des HCV lieferten der Nachweis von Minus- und Plusstrang-RNA des HCV in PBMCs (Ferri et al., 2003; Lerat et al., 1996; Morsica et al., 1999). Allerdings ist HCV-RNA nicht in allen Patienten nachweisbar und die Infektionsrate sowie die Replikationseffizienz in Lymphozyten ist sehr gering. Des Weiteren gelang es mehreren Gruppen in älteren Studien B- und T-Zelllinien mit HCV zu infizieren (Kato et al., 1995; Nissen et al., 1994; Shimizu et al., 1992). Entgegen diesen Beobachtungen konnten mit Hilfe der in dieser Arbeit generierten Pseudotypen weder B- noch T-Lymphozyten infiziert werden (siehe Abschnitt 4.2.1), was auch in anderen, neueren Studien beschrieben wurde (Bartosch et al., 2003a; Lavillette et al., 2005; McKeating et al., 2004). Betrachtet man die Tatsache, dass die Infektion von peripheren Blutzellen mit nativen HCV-Partikeln ineffizient ist und nur sehr geringe HCV-RNA Konzentrationen mit sensitiven Nachweismethoden (RT-PCR) detektierbar sind, ist anzunehmen, dass das Pseudotypen Modellsystem und die damit verbundenen Messmethoden für eine *in vitro* Infektion von primären Zellen nicht ausreichend sensitiv sind. Des Weiteren produzieren nativen Viren eine Vielfalt von genetisch unterschiedlichen Hüllproteinen unter denen möglicherweise eine geringe Teilpopulation eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweist, mit Rezeptoren von Lymphozyten zu interagieren und die Virusaufnahme zu bewirken. Möglicherweise könnte im Laufe der Virusreplikation auf diese Weise eine Selektion von lymphotropen Viren entstehen. Im Vergleich dazu sind die Pseudotypen durch eine konstante Konsensussequenz gekennzeichnet, welche im Falle dieser Arbeit nur

eine statistisch gemittelte Sequenz der Hüllproteine aufweist. Des Weiteren unterscheiden sich die Pseudotypen von nativen Viren auch bezüglich ihres Glykosylierungsmusters, das als sehr heterogen beschrieben wurde. Ebenso wurden HCV-Pseudotypen als heterogen bezüglich des Einbaus von E1/E2-Proteinaggregaten, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind charakterisiert (Flint et al., 2004). Auch diese morphologischen Unterschiede könnten dazu beitragen, dass mittels Pseudotypen bislang keine direkte Infektion von Lymphozyten beobachtet wurde.

5.2.3 E2-induzierte Aktivierung von B-Lymphozyten

Eine weitere Hypothese, die die Entwicklung der Kryoglobulinämie erklärt, ist eine direkte Bindung des E2-Proteins an den CD81-Rezeptor von B-Lymphozyten. Um reife B-Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen erfolgreich zu stimulieren, bedarf es neben dem B-Zell-Antigenrezeptor zusätzlicher Korezeptoren, welche Aktivierungssignale verstärken und modulieren. Hierzu zählt der CD81, welcher auf der Oberfläche der B-Zellen einen Komplex mit CD19, CD21 und mit MHC-Klasse II Molekülen bildet (Fearon and Carter, 1995). Möglicherweise wird dieser Komplex durch die Bindung des HCV-E2-Proteins aktiviert, was eine B-Zell Proliferation und Sekretion von unspezifischen Antikörpern durch Verminderung der Aktivierungsschwelle der Zellen auslösen könnte. Für T-Lymphozyten wurden bereits stimulierende Effekte dieser Art durch die Bindung des E2-Proteins an CD81 beschrieben (Wack et al., 2001). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression von CD81 auf B-Lymphozyten von HCV-Patienten mit assoziierter Kryoglobulinämie im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ist (Hofmann et al., 2004). Untermauert wird die E2-CD81 abhängige Aktivierung von B-Lymphozyten durch die kürzlich gezeigte *in vitro* Bindung des monoklonalen CD81 Antikörpers MG81 in Kombination mit E2-Proteinen, welche zu einer Proliferation von B-Lymphozyten führte (Rosa et al., 2005). Die Stimulation des CD81-Rezeptors mittels zweier CD81-Antikörpern (MG81 und N81) konnte ebenfalls eine Aktivierung von B-Lymphozyten induzieren (Rosa et al., 2005).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit eine Aktivierbarkeit von B-Lymphozyten durch Stimulation des CD81 mit E2-Proteinen untersucht. Hierzu wurden sowohl lösliche E2-Proteine als auch HCV-Pseudotypen verwendet. Durch IMAC isolierte, lösliche E2-Proteine konnte in Aktivierungsexperimenten eine vergleichbare Proteinkonzentrationen eingestellt werden, während die E2-Inkorporation auf HCV-Pseudotypen wegen fehlender E2-Antikörper nicht exakt bestimmt werden kann. Demgegenüber besitzen HCV-Pseudotypen den Vorteil einer komplexen Virusstruktur, wel-

che sich möglicherweise besser zur Zellstimulation eignet, da möglicherweise bereits durch ein einziges Partikel mehrere Zellrezeptoren stimuliert werden können. Wie von Rosa et al. (2005) beschrieben, resultiert die Stimulation der B-Lymphozyten mit den monoklonalen CD81 Antikörpern MG81 und N81 in einer erhöhten Expression der Aktivierungsmarker CD71 und CD86 (Abbildung 4.7). Dies spricht dafür, dass eine CD81-abhängige Aktivierung der Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen grundsätzlich reproduzierbar war. Wurde hingegen der CD81-Antikörper durch die in dieser Arbeit verwendeten E2-Proteine ersetzt, konnte keine Aktivierung im Vergleich zu unstimulierten Zellen detektiert werden (Abbildung 4.7).

Nach Stimulation der Zellen mit HCV-Pseudotypen konnte ebenfalls keine Aktivierung der B-Lymphozyten im Vergleich zu unstimulierten Zellen oder zur Stimulation mit SAC (Positivkontrolle) bzw. MG81 und N81 gemessen werden (Abbildung 4.7). Aus den gewonnenen Ergebnissen lassen sich keine Unterschiede zwischen Pseudotypen mit Hüllproteinen von Kryoglobulinämie-positiven Patienten und Pseudotypen mit Hüllproteinen von Kryoglobulinämie-negativen Patienten erkennen. Da sowohl die Stimulation mit SAC als auch die Antikörper Kombination MG81 und N81 zu einer messbaren Aktivierung von B-Lymphozyten führt, wäre es denkbar, dass die auf Konsensussequenzen beruhenden E2-Proteine Mutationen besitzen, welche eine Interaktion mit den beteiligten Rezeptoren der B-Lymphozyten stören.

5.2.4 E2-induzierte Sekretion von IgM Antikörpern

Da sich die Kryoglobulinämie Typ II durch eine vermehrte IgM Antikörperproduktion auszeichnet, wurde die IgM Konzentration nach Stimulation von PBMCs gesunder Probanden mit löslichen E2-Proteinen und mit HCV-Pseudotypen untersucht. Hierbei konnte keine mit löslichen E2-Proteinen induzierte IgM Antikörpersekretion gemessen werden (Abbildung 4.9).

Die in Abbildung 4.10 nach Stimulation mit HCV-Pseudotypen gemessenen relativen IgM Konzentrationsänderungen bezogen auf nicht stimulierte PBMCs, zeigten deutliche Unterschiede in der Antikörpersekretion. Der durch die Pseudotypen p289/85, p289/11632 und p289/21949 hervorgerufene IgM Zuwachs war deutlich stärker als der Zuwachs, der durch nicht-pseudotypisierte Kapside (NoEnv: Negativkontrolle) oder durch Pseudotypen mit nicht humanpathogenen Virushüllen induziert wurde (RD114). Dies könnte dafür sprechen, dass diese Pseudotypen eine HCV-spezifische IgM Produktion induzieren können. Allerdings besitzen nur die Pseudotypen p289-/11632 und p289/21949 Hüllproteine, die von Kryoglobulinämiepatienten abstammen. Die übrigen Pseudotypen zeigten IgM Produktionssteigerungen im Bereich nicht-pseudotypisierter Kapside. In dieser Gruppe befindet

sich lediglich ein Vertreter mit Hüllproteinen von Kryoglobulinämiepatienten (p289/22057). Daher konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Konsensussequenzen und dieser experimentellen Vorgehensweise kein eindeutiger, Kryoglobulinämie-spezifischer Effekt detektiert werden. Es ist hingegen gelungen ein System zu etablieren, mit dem spezifische Änderungen der IgM Produktion infolge einer Stimulation mit HCV-Pseudotypen erfasst werden können. Mit Hilfe dieses Systems könnte in weiteren Untersuchungen in einem höheren Durchsatz die IgM induzierende Wirkung einer statistisch relevante Anzahl von HCV-Hüllproteinen aus Kryoglobulinämie-positiven Seren mit Proteinen aus Kryoglobulinämie-negativen Seren verglichen werden. Hierbei könnten auch mit ortsgerichteter Mutagenese spezielle Mutationen, insbesondere im Bereich der HVR1, in Bezug auf die Änderungen der IgM-Konzentration analysiert werden. Insgesamt war die durchschnittliche IgM Konzentrationsänderung nach Stimulation mit HCV-Pseudotypen doppelt so groß wie die Konzentrationsänderung nach Stimulation mit löslichen E2-Antigenen. Diese Beobachtung könnte sich mit der komplexen Virusstruktur der Pseudotypen erklären lassen, die auf ihrer Oberfläche eine hohe Zahl von Hüllproteinen präsentieren. Dies würde einerseits zu einer mehrfachen Zellstimulierung führen und andererseits auch eine Potenzierung des Stimulus durch eine Vernetzung von gebundenen Rezeptoren hervorrufen.

Im Rahmen dieser experimentellen Vorgehensweise wurden auch native Hepatitis C Viren zur Stimulation verwendet, welche aus Patienten mit und ohne Kryoglobulinämie isoliert wurden. Die Stimulation mit nativen Viren ergab relative Änderung der IgM Antikörpersekretion von durchschnittlich 800 % (Abbildung 4.11), was eine deutliche Zunahme der IgM Konzentration im Vergleich zur Pseudotypen-Stimulation darstellt. Diese beachtliche Steigerung könnte darauf beruhen, dass native Viren die komplexe Quasispezies des Patienten repräsentieren, worunter sich möglicherweise, wie in Abschnitt 5.2.2 bereits diskutiert, eine geringe Teilpopulation verbirgt, welche stärker mit B-Zellen interagiert. Außerdem wurde die Menge der zur Zellstimulation eingesetzten Viren mit Hilfe der RNA-Konzentration ermittelt, wogegen die Menge von Pseudotypen oder deren Hüllproteine durch die Bestimmung von MLV-Core-Proteinen kontrolliert wurde. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die zugegebene Menge nativer HCV-Partikel größer war als die Menge zugegebener Pseudotypen. Bis auf zwei Fälle (21931 und 16572) lagen alle IgM Konzentrationsänderungen über 800 %. Auch mit Hilfe nativer HCV-Partikel konnte nicht das Vorhandensein eines Kryoglobulinämie spezifischen Effektes nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Antikörperreaktion infolge einer Stimulation mit Viren in einer Konzentration von 10000 IU ml^{-1} wie sie in diesen Experimenten eingesetzt wurde, zu stark um sequenzspezifische Effekte zu detektieren. Neben einer geringeren Zugabe an HCV-Partikel

wäre eine Erhöhung der ausgesäten Zellzahl von 1×10^8 PBMCs mL^{-1} im Verhältnis zur eingesetzten Viruskonzentration denkbar. In weiteren Versuchen könnte zusätzlich die Sensitivität des IgM ELISA durch Variation verschiedener Parameter wie z.B. Variation der Konzentrationen von primären und sekundären Antikörpern gesteigert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zum ersten Mal ein System etabliert wurde, welches in der Lage ist, die durch HCV-Pseudotypen oder native HCV-Partikel induzierte Änderung der IgM Produktion von PBMC zu erfassen. Letztendlich konnte aber weder die Verwendung von HCV-Pseudotypen noch von nativen Viren einen eindeutigen Hinweis für einen Kryoglobulinämie-spezifischen Effekt liefern (Abbildung 4.10). Die Verwendung von löslichen E2-Proteinen führte zu keinen signifikanten Änderungen der IgM Konzentration, was deren Eignung im vorgestellten System ausschließt.

Andere Arbeitsgruppen, die sich mit der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie beschäftigen, konnten keine sequenzspezifischen Effekte zeigen, die eine Entstehung der Kryoglobulinämie erklären (Bianchettin et al., 2007; Rigolet et al., 2005). Es werden eher wirtsspezifische, als virusspezifische Faktoren vermutet, welche die Entstehung der Krankheit auslösen wie z.B. erhöhtes Alter und Dauer der HCV-Infektion (Sene et al., 2004). Auch haben Patienten mit der Ausbildung des humanen Leukozytenantigens (HLA-DR11) ein erhöhtes Risiko eine Kryoglobulinämie zu entwickeln, während die Ausbildung des HLA-DR7 vor der Entstehung der Krankheit schützt (Cacoub et al., 2001; Congia et al., 1996). Eine dritte Hypothese zur Entstehung einer HCV-assoziierten Kryoglobulinämie ist die Beobachtung einer häufig vorkommenden Translokation in dem anti-apoptotisch wirkenden *B-cell lymphoma/leukemia* 2 Gen (*bcl2*) bei Patienten mit Kryoglobulinämie (Zignego et al., 1997, 1992). Die Überexpression dieses Onkogens führt zu einem verlängerten Überleben und der Expansion von B-Lymphozyten. Die gleiche Translokation t(14;18) ist auch die häufigste Form der genetischen Aberration, die in humanen Lymphomen gefunden wird (Korsmeyer, 1992).

5.2.5 Kritischer Vergleich der verwendeten Modellsysteme zur Erklärung einer HCV-assoziierten Kryoglobulinämie

Sowohl die HCV-Pseudotypen als auch die löslichen E2-Proteine basierten auf einer Konsensussequenz, die auf der Grundlage der im Patienten vorhandenen Quasiespezies berechnet wurde. Diese Vorgehensweise bietet zwar den Vorteil der Erhöhung der Wahrscheinlichkeit zur Produktion infektiöser HCV-Pseudotypen (siehe Abschnitt 5.1.1), allerdings besitzt sie auch den

Nachteil der dadurch nicht berücksichtigten Mutationen, welche möglicherweise eine Interaktion mit B-Lymphozyten begünstigen könnten. Deshalb besteht bei der Verwendung von nativen Viren der Vorteil im Vorhandensein der komplexen Quasiespezies des Patienten. Dadurch könnte die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen nativen Hüllproteinen und B-Lymphozyten gegenüber der Interaktion zwischen Konsensus-Hüllproteinen und B-Zellen erhöht sein (vergleiche Abbildung 4.10 mit Abbildung 4.11).

Ein zweiter kritischer Punkt stellt die Konzentration der E2-Proteine von Pseudotypen dar. Da für die in dieser Arbeit verwendeten E2-Proteine keine Antikörper zur Verfügung standen, ist deren Menge oder Anzahl auf der Oberfläche der Pseudotypen nicht bestimmbar. Die eingesetzte Menge an Pseudotypen wurde mittels Western Blot anhand der Detektion des MLV-Core-Proteins kontrolliert. Dies lieferte allerdings keine Information über den Zustand der Hüllproteine. Zum Beispiel könnten Hüllproteine einerseits fehlgefaltet in Pseudotypen eingebaut werden und andererseits überhaupt nicht an Pseudotypen gebunden sein. Neben der MLV Kontrolle müsste ein geeignetes Verfahren zur besseren Quantifizierung der Hüllproteine entwickelt werden, um die hier eingesetzten Messverfahren genauer zu gestalten.

5.3 Pseudotypen als Modellsystem zur Untersuchung neutralisierender Antikörper

Bei Patienten mit einer akuten, selbstlimitierenden HCV-Infektion wird eine starke, multispezifische CD4 und CD8 T-Zellantwort beobachtet (Cooper et al., 1999; Lechner et al., 2000; Thimme et al., 2001). Mutationen innerhalb des CD8 T-Zellepitops des HCV konnten bereits mit der Entstehung einer chronischen Infektion korreliert werden (Cox et al., 2005b; Erickson et al., 2001; Tester et al., 2005; Timm et al., 2004). Mutationen, die Aminosäure-Substitutionen verursachen, führen zum proteasomalen Abbau der CD8 T-Zellepitope oder zum Verlust der Bindungsfähigkeit von MHC-Molekülen (Bowen and Walker, 2005). Neben diesen bekannten T-Zellepitop *Escape*-Mutationen, die sowohl in strukturellen als auch nicht-strukturellen Bereichen des HCV Genoms auftreten, wird auch die HVR1, welche als B-Zellepitop identifiziert wurde (Isagulians et al., 2002; Nakamoto et al., 1996; Scarselli et al., 1995; Sekiya et al., 1994), für die Entstehung von *Escape*-Mutationen verantwortlich gemacht (Kato et al., 1994, 1993). Die HVR1 ist ein besonders variabler Bereich innerhalb des E2-Proteins (Kato et al., 1992; Weiner et al., 1991), der eine wichtige Rolle bei der Virusneutralisierung zu spielen scheint (Bartosch et al., 2003b; Farci et al., 1996; Keck et al., 2004;

Li et al., 2001; Mondelli et al., 2003; Owsianka et al., 2005; Roccasecca et al., 2001; Schofield et al., 2005; Zibert et al., 1995). Obwohl neutralisierende Antikörper in Seren von chronisch infizierten Patienten vorhanden sind, ist es dem Immunsystem nicht möglich das Virus zu eliminieren (Bartosch et al., 2003a; Logvinoff et al., 2004; Meunier et al., 2005). Im Schimpansenmodell konnte eine Infektion einerseits durch die Behandlung mit neutralisierenden Antikörper verhindert werden (Farci et al., 1996), während andererseits gegen HCV erworbene Antikörper keinen Schutz gegen eine erneute Infektion bei Schimpansen oder Menschen bieten (Farci et al., 1992; Lai et al., 1994). Mutationen innerhalb der HVR1 bewirken möglicherweise eine Immunselektion und werden daher als möglicher Grund für die Entstehung einer chronischen HCV-Infektion diskutiert (Higashi et al., 2005, 1993; Kato et al., 1994, 1993; Kurosaki et al., 1993; Ogata et al., 1991; Weiner et al., 1992). Auch im Falle der antiviralen Therapie mit Interferon wird vermutet, dass die immunmodulatorischen Effekte des Interferons verstärkt Veränderungen in der HVR1 selektionieren.

5.3.1 Entstehung von HVR1-Mutationen unter antiviraler Therapie

Bei einem Patienten, der unter Interferontherapie trotz kurzzeitiger Viruselimination rückfällig wurde, erfolgte die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Analyse zur Detektion von Quasispezies *Escape*-Mutationen (siehe Abschnitt 4.3.1). Die E1/E2-Aminosäuresequenz blieb bei diesem Patienten während der Therapie, mit Ausnahme des HVR1-Bereichs, konserviert. Zu Therapiewoche 18, was dem Zeitpunkt des Wiederanstiegs der Viruslast entspricht, sind interessanterweise zwei Mutationen innerhalb der HVR1 entstanden (T372H und T378A). Nach Therapieende konnten T372H weiterhin und eine weitere Mutation an Position 378 (T378A) detektiert werden. Die Selektion von Mutationen ausschließlich im Bereich der HVR1 könnte ein erster Hinweis auf einen Virus-*Escape*-Mechanismus liefern, was mit Hilfe der Pseudotypen im Folgenden näher untersucht wurde.

5.3.2 Virus-*Escape* und die Rolle der HVR1

Bei Betrachtung der Abbildung 4.12a kann leicht der Eindruck entstehen, dass die unter Therapie selektionierten HVR1-Mutationen nicht zu dem vermuteten Virus-*Escape* führen. In allen Seren zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten sind Antikörper vorhanden, die eine Infektion mit Pseudotypen zwischen 77 und 95 % inhibieren, unabhängig davon ob eine HVR1-Mutation

vorliegt (Abbildung 4.12a). So zirkulieren in Seren, die vor Entstehung der jeweiligen HVR1-Mutation entnommen wurden, bereits Antikörper, welche die mutierten Pseudotypen erkennen und neutralisieren. Es ist also wahrscheinlich, dass bereits vor der Selektion der Mutation bereits geringste Mengen von mutierten Viren ausreichen, um eine Immunreaktion mit Sekretion neutralisierender Antikörper zu induzieren. Ebenso scheinen Antikörpergenerationen im Laufe der Therapie nicht zu verschwinden, da sich auch unter Selektionsdruck wahrscheinlich nicht die Gesamtheit der Viruspopulation gleichzeitig verändert. Um dies zu untersuchen müsste eine umfangreiche Analyse der Quasiespezies zu den verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden. Des Weiteren kann eine Kreuzreaktivität der Antikörper nicht ausgeschlossen werden, da die untersuchten E1/E2-Proteine während der Therapie fast identisch sind. Möglicherweise existiert ein entweder vollständig oder teilweise im konservierten Bereich lokalisiertes Epitop, welches von mehreren Antikörper-Varianten erkannt wurde. In einigen Studien konnte durch Einsatz von synthetischen Oligopeptiden, basierend auf verschiedenen HVR1-Sequenzen von Patienten mit akuter und chronischer HCV-Infektion, eine breite Kreuzreaktivität zwischen nicht-verwandten HVR1-Sequenzen gezeigt werden, was die Vermutung einer Kreuzreaktivität der neutralisierenden Antikörper untermauert (Hattori et al., 1998; Jackson et al., 1997; Scarselli et al., 1995; Zibert et al., 1995).

Auffallend ist die Ähnlichkeit im zeitlichen Neutralisierungsprofil bei beiden Patienten. Abbildung 4.12a und Abbildung 4.12b zeigen in allen Fällen, dass die Infektion von Pseudotypen durch Zugabe des Serums chronisch infizierter Patienten um mindestens 50 % gegenüber der Neutralisierung durch Serum von HCV-negativen Spendern gehemmt wurde. Das HCV-Partikel und das HCV-Genom werden wahrscheinlich nicht beim ersten Antikörperkontakt systemisch eliminiert, sodass für eine gewisse Zeit das neutralisierte HCV weiterhin zum Ergebnis der Viruslastbestimmung beiträgt. Weiterhin zeigt die Viruslastbestimmung, dass sowohl im Falle des ETR als auch des NR Patienten eine enorme Zahl von HCV-Partikel im Patienten existieren.

Zwei interessante Korrelationen sind auffällig: ein starker Anstieg der Viruslast nach Therapie ist beim ETR-Patienten von einer vorhergehenden Abschwächung der Neutralisierung zu Therapiewoche 18 begleitet (Abbildung 4.12a), während der NR-Patient eine Abschwächung der Neutralisierung bereits zu Beginn der Therapie zeigt, um anschließend einen massiven Anstieg der Viruslast zu erleiden. Interessanterweise tauchen bei beiden Patienten Mutationen im E2-Protein in der Therapiewoche 18 auf (Tabelle 4.7). Ein weiteres interessantes Merkmal der Graphen betrifft die Konstanz der Viruslast zwischen Therapiewoche 18 und *follow-up* bei gleichzeitiger Neutralisierung von mehr als 50 % der Pseudotypen. Hohe Viruslasten bei konstant

hoher Neutralisierung können zwanglos durch eine dynamische Situation erklärt werden, bei der Milliarden von Viren in relativ kurzen Zeiträumen synthetisiert und gleichzeitig durch neutralisierende Antikörper aus dem System entfernt werden. Untersuchungen zur Viruskinetik haben entsprechend hohe Virusproduktionsraten und Halbwertszeiten von Viruspartikeln nachgewiesen (Herrmann and Zeuzem, 2006). Dieses System zeigt Konstanz, wenn Virussynthese und Eliminierung zu keiner Nettoveränderung der HCV Menge führen. Entsteht allerdings ein Ungleichgewicht zwischen diesen Faktoren, kann es entweder zur systemischen Eliminierung oder Erhöhung der Viruslast kommen. Ein solches Ungleichgewicht seitens des Immunsystems kann die Erklärung für die beobachtete Abschwächung der Neutralisierungswirkung sein, die von einem rasanten Anstieg der Viruslast gefolgt wurde. Dabei kann ein gering erscheinender Abfall der Neutralisierungswirkung von Antikörpern um wenige Prozent bereits zu massiven Viruslastzunahmen führen.

Anhand dieser Experimente könnte sich auch vermuten lassen, dass der Wiederanstieg der Viruslast durch die Entstehung von *Escape*-Mutationen innerhalb der HVR1 erklärbar wäre. Die zeitliche Abfolge dieser Ereignisse ist möglicherweise durch die hohe Dynamik des Systems etwas verschoben, wobei dennoch die generelle Feststellung getroffen werden kann: das Immunsystem kann nur reagieren. Daher ist auch eine gewisse zeitliche Differenz zwischen Neutralisierung und Viruslast zu beobachten.

Wie weit und mit welchen Mechanismen die Interferon Therapie in dieses Gleichgewicht eingreift bleibt zum jetzigen Zeitpunkt hypothetisch, wobei eine Interferon-Resistenz ebenfalls als möglicher Grund für den Wiederanstieg der Viruslast der Patienten in Betracht käme. Eine Interferon-Resistenz kann allerdings nicht mit Hilfe des Pseudotypen-Modells untersucht werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Interferon-Resistenz und HVR1 zu untersuchen, könnte das kürzlich entwickelte vollständige HCV-Zellkultursystem nach Behandlung mit Interferon auf die Entstehung von Mutationen analysiert werden (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005).

Der Einfluss der HVR1-Diversität und Komplexität auf das Interferon α induzierte Therapieansprechen wurde bereits in mehreren Studien untersucht, wobei die Ergebnisse teilweise widersprüchlich sind. In vielen Studien wurde eine höhere Mutationsrate der HVR1 mit einem schlechteren Therapieansprechen korreliert (Gonzalez-Peralta et al., 1996; Hino et al., 2000; Kanazawa et al., 1994; Koizumi et al., 1995; Moribe et al., 1995; Nagasaka et al., 1996; Okada et al., 1992; Pawlotsky et al., 1998; Shindo et al., 1996) während dies in anderen Studien nicht gezeigt werden konnte (Le Guen et al., 1997; Lopez-Labrador et al., 1999; Nakazawa et al., 1994; Sandres et al., 2000).

Literaturverzeichnis

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., Zhang, Q. X., Oct 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (22), 12766–12771.
- Agnello, V., Chung, R. T., Kaplan, L. M., Nov 1992. A role for hepatitis C virus infection in type 2 cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 327 (21), 1490–1495.
- Andréo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., Marcellin, P., Budkowska, A., Oct 2007. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol* 9 (10), 2445–2456.
- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H., Jul 1993. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 67 (7), 3835–3844.
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.-C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F.-L., Purcell, R. H., Nov 2003a. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (24), 14199–14204.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., Cosset, F.-L., Mar 2003b. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197 (5), 633–642.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.-M., Lavillette, D., Cosset, F.-L., Jul 2005. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 79 (13), 8217–8229.
- Berg, T., Sarrazin, C., Herrmann, E., Hinrichsen, H., Gerlach, T., Zachoval, R., Wiedenmann, B., Hopf, U., Zeuzem, S., Mar. 2003. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 37 (3), 600–609.
- Berkowitz, R., Ilves, H., Lin, W. Y., Eckert, K., Coward, A., Tamaki, S., Veres, G., Plavec, I., Apr 2001. Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *J Virol* 75 (7), 3371–3382.
- Bianchettin, G., Bonaccini, C., Oliva, R., Tramontano, A., Cividini, A., Casato, M., Merlini, G., Silini, E., Mondelli, M. U., May 2007. Analysis of hepatitis C virus hypervariable region 1 sequence from cryoglobulinemic patients and associated controls. *J Virol* 81 (9), 4564–4571.
- Blight, K., Lesniewski, R. R., LaBrooy, J. T., Gowans, E. J., Sep 1994. Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology* 20 (3), 553–557.
- Bowen, D. G., Walker, C. M., Jun 2005. Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J Exp Med* 201 (11), 1709–1714.
- Brouet, J. C., Clauvel, J. P., Danon, F., Klein, M., Seligmann, M., Nov 1974. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 57 (5), 775–788.

- Cacoub, P., Fabiani, F. L., Musset, L., Perrin, M., Frangeul, L., Leger, J. M., Huraux, J. M., Piette, J. C., Godeau, P., Feb 1994. Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Am J Med* 96 (2), 124–132.
- Cacoub, P., Renou, C., Kerr, G., Hüe, S., Rosenthal, E., Cohen, P., Kaplanski, G., Charlotte, F., Thibault, V., Ghillani, P., Piette, J. C., Caillat-Zucman, S., Sep 2001. Influence of HLA-DR phenotype on the risk of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 44 (9), 2118–2124.
- Chazal, N., Gerlier, D., Jun 2003. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (2), 226–37.
- Choo, Q., Kuo, G., Weiner, A., Overby, L., Bradley, D., Houghton, M., 1989. Isolation of a cDNA clone derived from blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362.
- Congia, M., Clemente, M. G., Dessi, C., Cucca, F., Mazzoleni, A. P., Frau, F., Lampis, R., Cao, A., Lai, M. E., Virgili, S. D., Dec 1996. HLA class II genes in chronic hepatitis C virus-infection and associated immunological disorders. *Hepatology* 24 (6), 1338–1341.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., Houghton, M., Parham, P., Walker, C. M., Apr 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10 (4), 439–449.
- Cox, A. L., Mosbruger, T., Lauer, G. M., Pardoll, D., Thomas, D. L., Ray, S. C., Jul 2005a. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* 42 (1), 104–112.
- Cox, A. L., Mosbruger, T., Mao, Q., Liu, Z., Wang, X.-H., Yang, H.-C., Sidney, J., Sette, A., Pardoll, D., Thomas, D. L., Ray, S. C., Jun 2005b. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 201 (11), 1741–1752.
- Cramp, M. E., Carucci, P., Rossol, S., Chokshi, S., Maertens, G., Williams, R., Naoumov, N. V., Mar 1999. Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia. *Gut* 44 (3), 424–429.
- Dammacco, F., Sansonno, D., Cornacchiulo, V., Mennuni, C., Carbone, R., Lauletta, G., Iacobelli, A. R., Rizzi, R., 1993. Hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia: a striking association. *Int J Clin Lab Res* 23 (1), 45–49.
- Dammacco, F., Sansonno, D., Piccoli, C., Tucci, F. A., Racanelli, V., Jul 2001. The cryoglobulins: an overview. *Eur J Clin Invest* 31 (7), 628–638.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y., Rice, C., Dubuisson, J., 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 71, 697–704.
- Demaision, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M., Thrasher, A., May 2002. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13 (7), 803–813.
- Diepolder, H. M., Zachoval, R., Hoffmann, R. M., Wierenga, E. A., Santantonio, T., Jung, M. C., Eichenlaub, D., Pape, G. R., Oct 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346 (8981), 1006–1007.
- Drummer, H. E., Maerz, A., Pountourios, P., Jul 2003. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* 546 (2–3), 385–390.
- Dubuisson, J., 2000. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 242, 135–148.
- Dubuisson, J., May 2007. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13 (17), 2406–2415.

- Duvet, S., Cocquerel, L., Pillez, A., Cacan, R., Verbert, A., Moradpour, D., Wychowski, C., Dubuisson, J., Nov. 1998. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J Biol Chem* 273 (48), 32088–32095.
- El-Hage, N., Luo, G., Oct 2003. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol* 84 (Pt 10), 2761–2769.
- Erickson, A. L., Kimura, Y., Igarashi, S., Eichelberger, J., Houghton, M., Sidney, J., McKinney, D., Sette, A., Hughes, A. L., Walker, C. M., Dec 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15 (6), 883–895.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., Rice, C. M., Apr 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446 (7137), 801–805.
- Farci, P., Alter, H., Govindarajan, S., Wong, D., Engle, R., Lesniewski, R., Mushahwar, I., Desai, S., Miller, R., Ogata, N., Purcell, R., 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258, 135–140.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., Gioannis, D. D., Strazzera, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J., Purcell, R. H., Dec 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (26), 15394–15399.
- Fearon, D. T., Carter, R. H., 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 127–149.
- Ferri, C., Civita, L. L., Longombardo, G., Zignego, A. L., Pasero, G., 1998. Mixed cryoglobulinaemia: a cross-road between autoimmune and lymphoproliferative disorders. *Lupus* 7 (4), 275–279.
- Ferri, C., Giuggioli, D., Cazzato, M., Sebastiani, M., Mascia, M. T., Zignego, A. L., 2003. HCV-related cryoglobulinemic vasculitis: an update on its etiopathogenesis and therapeutic strategies. *Clin Exp Rheumatol* 21 (6 Suppl 32), S78–S84.
- Ferri, C., Greco, F., Longombardo, G., Palla, P., Moretti, A., Marzo, E., Mazzoni, A., Pasero, G., Bombardieri, S., Highfield, P., 1991. Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol* 9 (6), 621–624.
- Ferri, C., Zignego, A. L., Pileri, S. A., Jan 2002. Cryoglobulins. *J Clin Pathol* 55 (1), 4–13.
- Flint, M., Logvinoff, C., Rice, C. M., McKeating, J. A., Jul 2004. Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol* 78 (13), 6875–6882.
- Fouchier, R. A., Malim, M. H., 1999. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res* 52, 275–299.
- Fried, M., Shiffman, M., Reddy, K., Smith, C., Marinos, G., Gonzales, F., Hüslinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffmann, J., Yu, J., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 347, 975–982.
- Füst, G., 1997. Enhancing antibodies in HIV infection. *Parasitology* 115 Suppl, S127–S140.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T., Olson, W. C., Apr 2003. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (8), 4498–4503.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C. A., Santantonio, T., Pape, G. R., Oct 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117 (4), 933–941.

- Germi, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zarski, J.-P., Drouet, E., Oct 2002. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 68 (2), 206–215.
- Gerotto, M., Pero, F. D., Loffreda, S., Bianchi, F. B., Alberti, A., Lenzi, M., Nov 2001. A 385 insertion in the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 envelope protein is found in some patients with mixed cryoglobulinemia type 2. *Blood* 98 (9), 2657–2663.
- Goffard, A., Dubuisson, J., 2003. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* 85 (3-4), 295–301.
- Gonzalez-Peralta, R., Qian, K., She, J., Davis, G., Ohno, T., Mizokami, M., Lau, J., Jul. 1996. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 49 (3), 242–247.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H., Bienz, K., Moradpour, D., May 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77 (9), 5487–5492.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., Hoegh, A. M., Bukh, J., Feb 2009. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* 49 (2), 364–377.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S., Rice, C., 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67, 1385–1395.
- Griffin, S. D. C., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. G., Rowlands, D. J., Jan 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535 (1-3), 34–38.
- Griffin, S. D. C., Harvey, R., Clarke, D. S., Barclay, W. S., Harris, M., Rowlands, D. J., Feb 2004. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 85 (Pt 2), 451–461.
- Grüner, N. H., Gerlach, T. J., Jung, M. C., Diepolder, H. M., Schirren, C. A., Schraut, W. W., Hoffmann, R., Zachoval, R., Santantonio, T., Cucchiaroni, M., Cerny, A., Pape, G. R., May 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 181 (5), 1528–1536.
- Hadziyannis, S. J., Sette, H., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P. J., Lin, A., Ackrill, A. M., Group, P. E. G. A. S. Y. S. I. S., Mar 2004. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140 (5), 346–355.
- Hattori, M., Yoshioka, K., Aiyama, T., Iwata, K., Terazawa, Y., Ishigami, M., Yano, M., Kakumu, S., Jun 1998. Broadly reactive antibodies to hypervariable region 1 in hepatitis C virus-infected patient sera: relation to viral loads and response to interferon. *Hepatology* 27 (6), 1703–1710.
- Herrmann, E., Zeuzem, S., Apr 2006. The kinetics of hepatitis C virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18 (4), 339–342.
- Higashi, K., Tsukiyama-Kohara, K., Tanaka, T., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Kohara, M., May 2005. Characterization of hypervariable region in hepatitis C virus envelope protein during acute and chronic infection. *Arch Virol* 150 (5), 883–898.
- Higashi, Y., Kakumu, S., Yoshioka, K., Wakita, T., Mizokami, M., Ohba, K., Ito, Y., Ishikawa, T., Takayanagi, M., Nagai, Y., Dec 1993. Dynamics of genome change in the E2/NS1 region of hepatitis C virus in vivo. *Virology* 197 (2), 659–668.

- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., Shimotohno, K., Aug 1993a. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67 (8), 4665–4675.
- Hijikata, M., Shimizu, Y. K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J. W., Alter, H. J., Purcell, R. H., Yoshikura, H., Apr 1993b. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 67 (4), 1953–1958.
- Hino, K., Yamaguchi, Y., Fujiwara, D., Katoh, Y., Korenaga, M., Okazaki, M., Okuda, M., Okita, K., Jan 2000. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study. *J Viral Hepat* 7 (1), 36–42.
- Hofmann, W., Herrmann, E., Kronenberger, B., Merkwirth, C., Welsch, C., Lengauer, T., Zeuzem, S., Sarrazin, C., Aug. 2004. Association of HCV-related mixed cryoglobulinemia with specific mutational pattern of the HCV E2 protein and CD81 expression on peripheral B lymphocytes. *Blood* 104 (4), 1228–1229.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., McKeating, J. A., Jun 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (12), 7271–7276.
- Hu, K., Vierling, J., Redeker, A., Jan. 2001. Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 8 (1), 1–18.
- Hézode, C., Forestier, N., Dusheiko, G., Ferenci, P., Pol, S., Goeser, T., Bronowicki, J.-P., Bourlière, M., Gharakhanian, S., Bengtsson, L., McNair, L., George, S., Kieffer, T., Kwong, A., Kauffman, R. S., Alam, J., Pawlotsky, J.-M., Zeuzem, S., Team, P. R. O. V. E. S., Apr 2009. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360 (18), 1839–1850.
- Isaguliant, M. G., Widell, A., Zhang, S. M., Sidorchuk, A., Levi, M., Smirnov, V. D., Santantonio, T., Diepolder, H. M., Pape, G. R., Nordenfelt, E., Feb 2002. Antibody responses against B-cell epitopes of the hypervariable region 1 of hepatitis C virus in self-limiting and chronic human hepatitis C followed-up using consensus peptides. *J Med Virol* 66 (2), 204–217.
- Jackson, P., Petrik, J., Alexander, G. J., Pearson, G., Allain, J. P., Jan 1997. Reactivity of synthetic peptides representing selected sections of hepatitis C virus core and envelope proteins with a panel of hepatitis C virus-seropositive human plasma. *J Med Virol* 51 (1), 67–79.
- Jeffers, L., Cassidy, W., Howell, C., Hu, S., Reddy, K., Jun. 2004. Peginterferon alfa-2a (40 kd) and ribavirin for black American patients with chronic HCV genotype 1. *Hepatology* 39 (6), 1702–1708.
- Kanazawa, Y., Hayashi, N., Mita, E., Li, T., Hagiwara, H., Kasahara, A., Fusamoto, H., Kamada, T., Nov. 1994. Influence of viral quasispecies on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 20 (5), 1121–1130.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., Shimotohno, K., Nov 1994. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun* 205 (1), 320–326.
- Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., Kasahara, A., Fusamoto, H., Kamada, T., Feb 1994. Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* 19 (2), 296–302.
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuma, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., Shimotohno, K., 1990. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87, 9524–9528.
- Kato, N., Nakazawa, T., Mizutani, T., Shimotohno, K., Jan 1995. Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 206 (3), 863–869.

- Kato, N., Ootsuyama, Y., Sekiya, H., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Hijikata, M., Shimotohno, K., 1994. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 68, 4776–4784.
- Kato, N., Ootsuyama, Y., Tanaka, T., Nakagawa, M., Nakazawa, T., Muraiso, K., Ohkoshi, S., Hijikata, M., Shimotohno, K., Feb. 1992. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res* 22 (2), 107–123.
- Kato, N., Sekiya, H., Ootsuyama, Y., Nakazawa, T., Hijikata, M., Ohkoshi, S., Shimotohno, K., Jul 1993. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 67 (7), 3923–3930.
- Keck, Z.-Y., Beeck, A. O. D., Hadlock, K. G., Xia, J., Li, T.-K., Dubuisson, J., Foung, S. K. H., Sep 2004. Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. *J Virol* 78 (17), 9224–9232.
- Kieffer, T. L., Sarrazin, C., Miller, J. S., Welker, M. W., Forestier, N., Reesink, H. W., Kwong, A. D., Zeuzem, S., Sep 2007. Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology* 46 (3), 631–639.
- Koch, J. O., Bartenschlager, R., Sep 1999. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* 73 (9), 7138–7146.
- Koizumi, K., Enomoto, N., Kurosaki, M., Murakami, T., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C., Jul. 1995. Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology* 22 (1), 30–35.
- Korsmeyer, S. J., Aug 1992. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80 (4), 879–886.
- Kurosaki, M., Enomoto, N., Marumo, F., Sato, C., 1993. Rapid sequence variation of the hypervariable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology* 18, 1293–1299.
- Lai, M. E., Mazzoleni, A. P., Argioli, F., Virgilis, S. D., Balestrieri, A., Purcell, R. H., Cao, A., Farci, P., Feb 1994. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* 343 (8894), 388–390.
- Lavillette, D., Tarr, A., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A., Dubuisson, J., Ball, J., Cosset, F., Feb. 2005. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 41 (2), 265–274.
- Le Guen, B., Squadrito, G., Nalpas, B., Berthelot, P., Pol, S., Brechot, C., May 1997. Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 25 (5), 1250–1254.
- Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., Walker, B. D., May 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191 (9), 1499–1512.
- Lerat, H., Berby, F., Traubaud, M. A., Vidalin, O., Major, M., Trépo, C., Inchauspé, G., Feb 1996. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 97 (3), 845–851.
- Li, C., Candotti, D., Allain, J. P., Dec 2001. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for a conserved epitope within hepatitis C virus hypervariable region 1. *J Virol* 75 (24), 12412–12420.
- Liang, T. J., Rehmann, B., Seeff, L. B., Hoofnagle, J. H., Feb 2000. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 132 (4), 296–305.
- Lin, C., Gates, C., Govinda, R. B., Brennan, D., Fulghum, J., Luong, Y., Daniel, F. J., Lin, K., Ma, S., Wei, Y., Perni, R., Kwong, A., Sep. 2005. In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *J.Biol.Chem.*, –.

- Lin, C., Lin, K., Luong, Y.-P., Rao, B. G., Wei, Y.-Y., Brennan, D. L., Fulghum, J. R., Hsiao, H.-M., Ma, S., Maxwell, J. P., Cottrell, K. M., Perni, R. B., Gates, C. A., Kwong, A. D., Apr 2004. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem* 279 (17), 17508–17514.
- Lin, C., Wu, J., Hsiao, K., Su, M., 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A protein. *J Virol* 71, 6465–6471.
- Lindenbach, B., Evans, M., Syder, A., Wolk, B., Tellinghuisen, T., Liu, C., Maruyama, T., Hynes, R., Burton, D., McKeating, J., Rice, C., Jul. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309 (5734), 623–626.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S. M., Alter, H., Rice, C. M., McKeating, J. A., Jul 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (27), 10149–10154.
- Lopez-Labrador, F., Ampurdanes, S., Gimenez-Barcons, M., Guilera, M., Costa, J., Jimenez de Anta, M., Sanchez-Tapias, J., Rodes, J., Saiz, J., Mar. 1999. Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection [published erratum appears in *Hepatology* 1999 Jun;29(6):1915]. *Hepatology* 29 (3), 897–903.
- Love, A., Parge, H., Wickersham, J., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, E., Adachi, T., Hostomska, Z., 1996. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 87 (331), 342–.
- Lozach, P.-Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.-L., Altmeyer, R., Jul 2004. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279 (31), 32035–32045.
- Lozach, P.-Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foung, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Altmeyer, R., May 2003. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278 (22), 20358–20366.
- Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Heijne, G. V., Persson, M. A. A., May 2003. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77 (9), 5428–5438.
- Mangia, A., Santoro, R., Minerva, N., Ricci, G. L., Carretta, V., Persico, M., Vinelli, F., Scotto, G., Bacca, D., Annese, M., Romano, M., Zechini, F., Sogari, F., Spirito, F., Andriulli, A., Jun 2005. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 352 (25), 2609–2617.
- Manns, M., McHutchison, J., Gordon, S., Rustgi, V., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J., Sep. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358 (9286), 958–965.
- McHutchison, J. G., Everson, G. T., Gordon, S. C., Jacobson, I. M., Sulkowski, M., Kauffman, R., McNair, L., Alam, J., Muir, A. J., Team, P. R. O. V. E. S., Apr 2009. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 360 (18), 1827–1838.
- McKeating, J. A., Zhang, L. Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., Butera, D., Ho, D. D., Dustin, L. B., Rice, C. M., Balfe, P., Aug 2004. Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol* 78 (16), 8496–8505.
- Meunier, J.-C., Engle, R. E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S. U., Cosset, F.-L., Purcell, R. H., Bukh, J., Mar 2005. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (12), 4560–4565.
- Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M., Dubuisson, J., Sep 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 78 (Pt 9), 2299–2306.

- Migliaccio, G., Tomassini, J. E., Carroll, S. S., Tomei, L., Altamura, S., Bhat, B., Bartholomew, L., Bosserman, M. R., Ceccacci, A., Colwell, L. F., Cortese, R., Francesco, R. D., Eldrup, A. B., Getty, K. L., Hou, X. S., LaFemina, R. L., Ludmerer, S. W., MacCoss, M., McMasters, D. R., Stahlhut, M. W., Olsen, D. B., Hazuda, D. J., Flores, O. A., Dec 2003. Characterization of resistance to non-obligate chain-terminating ribonucleoside analogs that inhibit hepatitis C virus replication in vitro. *J Biol Chem* 278 (49), 49164–49170.
- Misiani, R., Bellavita, P., Fenili, D., Borelli, G., Marchesi, D., Massazza, M., Vendramin, G., Comotti, B., Tanzi, E., Scudeller, G., Oct 1992. Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 117 (7), 573–577.
- Monazahian, M., Kippenberger, S., Müller, A., Seitz, H., Böhme, I., Grethe, S., Thomssen, R., Jun 2000. Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus. *Med Microbiol Immunol* 188 (4), 177–184.
- Mondelli, M. U., Cerino, A., Meola, A., Nicosia, A., Apr 2003. Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1? Implications for immune responses. *J Biosci* 28 (3), 305–310.
- Moribe, T., Hayashi, N., Kanazawa, Y., Mita, E., Fusamoto, H., Negi, M., Kaneshige, T., Igimi, H., Kamada, T., Uchida, K., Mar. 1995. Hepatitis C viral complexity detected by single-strand conformation polymorphism and response to interferon therapy. *Gastroenterology* 108 (3), 789–795.
- Morsica, G., Tambussi, G., Sitia, G., Novati, R., Lazzarin, A., Lopalco, L., Mukenge, S., Aug 1999. Replication of hepatitis C virus in B lymphocytes (CD19+). *Blood* 94 (3), 1138–1139.
- Mselli-Lakhal, L., Favier, C., Teixeira, M. F. D. S., Chettab, K., Legras, C., Ronfort, C., Verdier, G., Mornex, J. F., Chebloune, Y., 1998. Defective RNA packaging is responsible for low transduction efficiency of CAEV-based vectors. *Arch Virol* 143 (4), 681–695.
- Murphy, D., Chamberland, J., Dandavino, R., Sablon, E., 2007. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa [Abstract]. *Hepatology* 46, 623A.
- Nagasaka, A., Hige, S., Tsunematsu, I., Yoshida, J., Sasaki, Y., Matsushima, T., Asaka, M., Nov. 1996. Changes in hepatitis C virus quasispecies and density populations in patients before and after interferon therapy. *J Med Virol* 50 (3), 214–220.
- Nakamoto, Y., Kaneko, S., Ohno, H., Honda, M., Unoura, M., Murakami, S., Kobayashi, K., Sep 1996. B-cell epitopes in hypervariable region 1 of hepatitis C virus obtained from patients with chronic persistent hepatitis. *J Med Virol* 50 (1), 35–41.
- Nakazawa, T., Kato, N., Ohkoshi, S., Shibuya, A., Shimotohno, K., May 1994. Characterization of the 5' noncoding and structural region of the hepatitis C virus genome from patients with non-A, non-B hepatitis responding differently to interferon treatment. *J Hepatol.* 20 (5), 623–629.
- Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F., Verma, I., Trono, D., Apr. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272 (5259), 263–267.
- Nissen, E., Höhne, M., Schreier, E., Mar 1994. In vitro replication of hepatitis C virus in a human lymphoid cell line (H9). *J Hepatol* 20 (3), 437.
- Ogata, N., Alter, H., Miller, R., Purcell, R., 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 88, 3392–3396.
- Okada, S., Akahane, Y., Suzuki, H., Okamoto, H., Mishiro, S., Sep. 1992. The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 16 (3), 619–624.
- Olsen, D. B., Eldrup, A. B., Bartholomew, L., Bhat, B., Bosserman, M. R., Ceccacci, A., Colwell, L. F., Fay, J. F., Flores, O. A., Getty, K. L., Grobler, J. A., LaFemina, R. L., Markel, E. J., Migliaccio, G., Prhac, M., Stahlhut, M. W., Tomassini, J. E., MacCoss, M., Hazuda, D. J., Carroll, S. S., Oct 2004. A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (10), 3944–3953.

- Owsianka, A., Tarr, A. W., Juttla, V. S., Lavillette, D., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Ball, J. K., Patel, A. H., Sep 2005. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 79 (17), 11095–11104.
- Pascual, M., Perrin, L., Giostra, E., Schifferli, J. A., Aug 1990. Hepatitis C virus in patients with cryoglobulinemia type 2. *J Infect Dis* 162 (2), 569–570.
- Pawlotsky, J. M., 1999. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol* 31 Suppl 1, 71–79.
- Pawlotsky, J. M., Nov 2000. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* 32 (5), 889–896.
- Pawlotsky, J.-M., Feb 2003a. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 7 (1), 45–66.
- Pawlotsky, J. M., Jun 2003b. Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral Res* 59 (1), 1–11.
- Pawlotsky, J. M., Pellerin, M., Bouvier, M., Roudot-Thoraval, F., Germanidis, G., Bastie, A., Darthuy, F., Rémiré, J., Soussy, C. J., Dhumeaux, D., Apr 1998. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 54 (4), 256–264.
- Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P., Deleage, G., Pawlotsky, J., Jun. 2001. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis c virus e2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol* 75 (12), 5703–5710.
- Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R. W., Rice, C. M., McKeating, J. A., Apr 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77 (7), 4070–4080.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S., 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938–941.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P., Rice, C. M., Feb 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457 (7231), 882–886.
- Poeschla, E. M., Oct 2003. Non-primate lentiviral vectors. *Curr Opin Mol Ther* 5 (5), 529–540.
- Poeschla, E. M., Wong-Staal, F., Looney, D. J., Mar 1998. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* 4 (3), 354–357.
- Post, J. J., Pan, Y., Freeman, A. J., Harvey, C. E., White, P. A., Palladinetti, P., Haber, P. S., Marinos, G., Levy, M. H., Kaldor, J. M., Dolan, K. A., Ffrench, R. A., Lloyd, A. R., Rawlinson, W. D., Incidence, H. C., in Prisons Study (HITS) Group, T., May 2004. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis* 189 (10), 1846–1855.
- Preugschat, F., Averett, D., Clarke, B., Porter, D., 1996. A steady state and pre-steady-state kinetic analysis of the NTPase activity associated with the hepatitis C virus NS3 helicase domain. *J Biol Chem* 271, 24449–24457.
- Pumeechockchai, W., Bevitt, D., Agarwal, K., Petropoulou, T., Langer, B. C. A., Belohradsky, B., Bas-sendine, M. F., Toms, G. L., Nov 2002. Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. *J Med Virol* 68 (3), 335–342.
- Rawat, S. S., Viard, M., Gallo, S. A., Rein, A., Blumenthal, R., Puri, A., 2003. Modulation of entry of enveloped viruses by cholesterol and sphingolipids (Review). *Mol Membr Biol* 20 (3), 243–254.

- Reiser, M., Hinrichsen, H., Benhamou, J., Reesink, H., Wedemeyer, H., Avendano, C., Riba, N., Yong, C., Nehmiz, G., Steinmann, G., 2005. Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* 41, 832–835.
- Rigolet, A., Cacoub, P., Schnuriger, A., Vallat, L., Cahour, A., Ghillani, P., Davi, F., Benhamou, Y., Piette, J.-C., Thibault, V., Jun 2005. Genetic heterogeneity of the hypervariable region I of Hepatitis C virus and lymphoproliferative disorders. *Leukemia* 19 (6), 1070–1076.
- Rigotti, A., Miettinen, H. E., Krieger, M., Jun 2003. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev* 24 (3), 357–387.
- Roccasecca, R., Folgori, A., Ercole, B. B., Puntoriero, G., Lahm, A., Zucchelli, S., Tafi, R., Pezzanera, M., Galfre, G., Tramontano, A., Mondelli, M. U., Pessi, A., Nicosia, A., Cortese, R., Meola, A., 2001. Induction of cross-reactive humoral immune response by immunization with mimotopes of the hypervariable region 1 of the hepatitis C virus. *Int Rev Immunol* 20 (2), 289–300.
- Rosa, D., Saletti, G., Gregorio, E. D., Zorat, F., Comar, C., D'Oro, U., Nuti, S., Houghton, M., Barnaba, V., Pozzato, G., Abrignani, S., Dec 2005. Activation of naïve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (51), 18544–18549.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C., Dubuisson, J., Mar 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* 80 (6), 2832–2841.
- Sandres, K., Dubois, M., Pasquier, C., Payen, J., Alric, L., Duffaut, M., Vinel, J., Pascal, J., Puel, J., Izopet, J., Jan. 2000. Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J Virol* 74 (2), 661–668.
- Sandrin, V., Boulanger, P., Penin, F., Granier, C., Cosset, F.-L., Bartosch, B., Dec 2005. Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *J Gen Virol* 86 (Pt 12), 3189–3199.
- Sanger, F., Dec 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214 (4526), 1205–1210.
- Sansonno, D., Vita, S. D., Iacobelli, A. R., Cornacchiulo, V., Boiocchi, M., Dammacco, F., Apr 1998. Clonal analysis of intrahepatic B cells from HCV-infected patients with and without mixed cryoglobulinemia. *J Immunol* 160 (7), 3594–3601.
- Santolini, E., Migliaccio, G., La Monica, N., Jun. 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 68 (6), 3631–3641.
- Sarrazin, C., Dragan, A., Gärtner, B. C., Forman, M. S., Traver, S., Zeuzem, S., Valsamakis, A., Oct 2008. Evaluation of an automated, highly sensitive, real-time PCR-based assay (COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan) for quantification of HCV RNA. *J Clin Virol* 43 (2), 162–168.
- Sarrazin, C., Kieffer, T. L., Bartels, D., Hanzelka, B., Müh, U., Welker, M., Wincheringer, D., Zhou, Y., Chu, H.-M., Lin, C., Weegink, C., Reesink, H., Zeuzem, S., Kwong, A. D., May 2007a. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132 (5), 1767–1777.
- Sarrazin, C., Rouzier, R., Wagner, F., Forestier, N., Larrey, D., Gupta, S. K., Hussain, M., Shah, A., Cutler, D., Zhang, J., Zeuzem, S., Apr 2007b. SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology* 132 (4), 1270–1278.
- Sarrazin, C., Zeuzem, S., Feb 2010. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138 (2), 447–462.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A., Oct 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21 (19), 5017–5025.

- Scarselli, E., Cerino, A., Esposito, G., Silini, E., Mondelli, M. U., Traboni, C., Jul 1995. Occurrence of antibodies reactive with more than one variant of the putative envelope glycoprotein (gp70) hypervariable region 1 in viremic hepatitis C virus-infected patients. *J Virol* 69 (7), 4407–4412.
- Schofield, D. J., Bartosch, B., Shimizu, Y. K., Allander, T., Alter, H. J., Emerson, S. U., Cosset, F.-L., Purcell, R. H., Nov 2005. Human monoclonal antibodies that react with the E2 glycoprotein of hepatitis C virus and possess neutralizing activity. *Hepatology* 42 (5), 1055–1062.
- Sekiya, H., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakazawa, T., Yamauchi, K., Shimotohno, K., Jun 1994. Genetic alterations of the putative envelope proteins encoding region of the hepatitis C virus in the progression to relapsed phase from acute hepatitis: humoral immune response to hypervariable region 1. *Int J Cancer* 57 (5), 664–670.
- Sene, D., Ghillani-Dalbin, P., Thibault, V., Guis, L., Musset, L., Duhaut, P., Poynard, T., Piette, J.-C., Cacoub, P., Nov 2004. Longterm course of mixed cryoglobulinemia in patients infected with hepatitis C virus. *J Rheumatol* 31 (11), 2199–2206.
- Sherer, N. M., Lehmann, M. J., Jimenez-Soto, L. F., Ingmundson, A., Horner, S. M., Cicchetti, G., Allen, P. G., Pypaert, M., Cunningham, J. M., Mothes, W., Nov 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 4 (11), 785–801.
- Shimizu, Y. K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R. H., Yoshikura, H., Jun 1992. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (12), 5477–5481.
- Shindo, M., Hamada, K., Koya, S., Arai, K., Sokawa, Y., Okuno, T., Nov. 1996. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* 24 (5), 1018–1023.
- Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J., Urdea, M. S., Nov 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74 (Pt 11), 2391–2399.
- Smith, D. B., Pathirana, S., Davidson, F., Lawlor, E., Power, J., Yap, P. L., Simmonds, P., Feb 1997. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 78 (Pt 2), 321–328.
- Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M. L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G. J., Powell, E., Riordan, S., Sheridan, D., Smedile, A., Fragomeli, V., Müller, T., Bahlo, M., Stewart, G. J., Booth, D. R., George, J., Oct 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41 (10), 1100–1104.
- Susser, S., Welsch, C., Wang, Y., Zettler, M., Domingues, F. S., Karey, U., Hughes, E., Ralston, R., Tong, X., Herrmann, E., Zeuzem, S., Sarrazin, C., Dec 2009. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 50 (6), 1709–1718.
- Suzich, J., Tamura, J., Palmer-Hill, F., Warrenner, P., Grakoui, A., Rice, C., Feinstone, S., Collett, M., 1993. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 67, 6152–6158.
- Tai, C., Chi, W., Chen, D., Hwang, L., 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70, 8477–8484.
- Takada, A., Kawaoka, Y., 2003. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. *Rev Med Virol* 13 (6), 387–398.
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J. L., Manns, M. P., Rehmann, B., May 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6 (5), 578–582.
- Tan, S., Katze, M., May 2001. How Hepatitis C Virus Counteracts the Interferon Response: The Jury Is Still out on NS5A. *Virology* 284 (1), 1–12.

- Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., Shimotohno, K., Jul 1995. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J Virol* 69 (7), 3980–3986.
- Tellinghuisen, T., Marcotrigiano, J., Rice, C., May 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435 (7040), 374–379.
- Tester, I., Smyk-Pearson, S., Wang, P., Wertheimer, A., Yao, E., Lewinsohn, D. M., Tavis, J. E., Rosen, H. R., Jun 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med* 201 (11), 1725–1731.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H., Chisari, F. V., Nov 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24), 15661–15668.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C., Chisari, F. V., Nov 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194 (10), 1395–1406.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Köchel, H. G., Uy, A., 1992. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 181 (5), 293–300.
- Timm, J., Lauer, G. M., Kavanagh, D. G., Sheridan, I., Kim, A. Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L. L., zur Wiesch, J. S., Gandhi, R. T., Chung, R. T., Bhardwaj, N., Klenerman, P., Walker, B. D., Allen, T. M., Dec 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200 (12), 1593–1604.
- Tong, X., Chase, R., Skelton, A., Chen, T., Wright-Minogue, J., Malcolm, B. A., Jun 2006. Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res* 70 (2), 28–38.
- Tsai, S. L., Liaw, Y. F., Chen, M. H., Huang, C. Y., Kuo, G. C., Feb 1997. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 25 (2), 449–458.
- Ulsenheimer, A., Gerlach, J. T., Gruener, N. H., Jung, M.-C., Schirren, C.-A., Schraut, W., Zachoval, R., Pape, G. R., Diepolder, H. M., May 2003. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 37 (5), 1189–1198.
- Wack, A., Soldaini, E., Tseng, C., Nuti, S., Klimpel, G., Abrignani, S., Jan 2001. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 31 (1), 166–175.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T. J., Jul 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 (7), 791–796.
- Wedemeyer, H., He, X.-S., Nascimbeni, M., Davis, A. R., Greenberg, H. B., Hoofnagle, J. H., Liang, T. J., Alter, H., Rehermann, B., Sep 2002. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 169 (6), 3447–3458.
- Weiner, A., Brauer, M., Rosenblatt, J., Richman, K., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q., Houghton, M., Feb. 1991. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180 (2), 842–848.
- Weiner, A., Geysen, H., Christopherson, C., Hall, J., Mason, T., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C., Crawford, K., Brunetto, M., Barr, P., Miyamura, T., McHutchison, J., Houghton, M., 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3468–3472.
- Welsch, C., Domingues, F., Susser, S., Antes, I., Hartmann, C., Mayr, G., Schlicker, A., Sarrazin, C., Albrecht, M., Zeuzem, S., Lengauer, T., Jan 2008. Molecular basis of telaprevir resistance due to V36 and T54 mutations in the NS3-4A protease of the hepatitis C virus. *Genome Biol* 9 (1), R16.

- Wohnsland, A., Hofmann, W. P., Sarrazin, C., Jan 2007. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 20 (1), 23–38.
- Woitäs, R. P., Lechmann, M., Jung, G., Kaiser, R., Sauerbruch, T., Spengler, U., Jul 1997. CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* 159 (2), 1012–1018.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M., Ou, J., 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO* 20, 3840–3848.
- Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J., Kohara, M., 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 72, 6048–6055.
- Zeuzem, S., Diago, M., Gane, E., Reddy, K., Pockros, P., Prati, D., Shiffman, M., Farci, P., Gitlin, N., O'Brien, C., Lamour, F., Lardelli, P., Dec. 2004a. Peginterferon alfa-2a (40 kilodaltons) and ribavirin in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 127 (6), 1724–1732.
- Zeuzem, S., Hultcrantz, R., Bourliere, M., Goeser, T., Marcellin, P., Sanchez-Tapias, J., Sarrazin, C., Harvey, J., Brass, C., Albrecht, J., Jun 2004b. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 40 (6), 993–999.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M., McKeating, J. A., Feb 2004a. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78 (3), 1448–1455.
- Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C., Korber, B., Dec 2004b. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 14 (12), 1229–1246.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M., Deng, H., Nov 2007. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81 (22), 12465–12471.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., Chisari, F. V., Jun 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (26), 9294–9299.
- Zibert, A., Schreier, E., Roggendorf, M., 1995. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* 208, 653–661.
- Zignego, A. L., Giannelli, F., Marrocchi, M. E., Giannini, C., Gentilini, P., Innocenti, F., Ferri, C., 1997. Frequency of bcl-2 rearrangement in patients with mixed cryoglobulinemia and HCV-positive liver diseases. *Clin Exp Rheumatol* 15 (6), 711–712.
- Zignego, A. L., Macchia, D., Monti, M., Thiers, V., Mazzetti, M., Foschi, M., Maggi, E., Romagnani, S., Gentilini, P., Bréchet, C., Jul 1992. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 15 (3), 382–386.
- Zuckerman, E., Zuckerman, T., Levine, A. M., Douer, D., Gutekunst, K., Mizokami, M., Qian, D. G., Velankar, M., Nathwani, B. N., Fong, T. L., Sep 1997. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med* 127 (6), 423–428.

Publikationen

Posterpräsentationen

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- **2006:** 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) in Boston
- **2007:** 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses in Glasgow

Themen

Neutralizing antibodies derived from patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection inhibit HCV pseudoparticles

Clinically characterized HCV pseudo particles as a model for the study of lymphomagenesis in chronic hepatitis C

Publikationen

Wohnsland, A., Hofman, WP., and C. Sarrazin. 2007. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. Clin Microbiol Rev 20: 23-38

Sarrazin, C., **Dragan, A.**, Gärtner, BC., Forman, MS., Traver, S., Zeuzem, S., and A. Valsamakis. 2008. Evaluation of an automated, highly sensitive, real-time PCR-based assay (COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan) for quantification of HCV-RNA. J Clin Virol 43: 162-8

Stipendien und Auszeichnungen im Rahmen dieser Arbeit

- Homburger Forschungsförderungsprogramm HOMFOR 2007
- Boehringer Ingelheimpreis, Forschungspreis 2006

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Sarrazin für die Überlassung des interessanten Themengebiets und für die stetige herzliche Förderung, die zahlreichen Diskussionen und die Unterstützung während meiner gesamten Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. S. Zeuzem, Direktor der Medizinischen Klinik 1, für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und für die sehr gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Scheidig für sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit sehr herzlich bedanken.

Ein ausdrückliches Dankeschön gilt meinen Arbeitskollegen, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, und mir wertvolle praktische und theoretische Tipps für meine Arbeit gegeben haben. Danke für das tolle Arbeitsklima und die schönen Stunden zusammen. Insbesondere Danke ich Simone und Laura für ihre Unterstützung und Freundschaft.

Für Hilfestellungen bei der Etablierung des Pseudotypensystems danke ich Frau Dr. T. Girolou und Frau Prof. Dr. D. von Laer (Georg-Speyer Haus, FaM), sowie Frau Dr. B. Bartosch und Herrn Prof. Dr. F.L. Cosset (École normale supérieure, Lyon). Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Dr. Birke Bartosch für die herzliche Betreuung während meines Forschungsaufenthaltes in Lyon und für die darüberhinausgehende ausgezeichnete Kooperations- und Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank geht auch an all meine Freunde und Verwandten, die mich immer in allen Lebenslagen begleitet und unterstützt haben.

Zuletzt will ich meinen Eltern Marlene und Walter, sowie speziell meinem Mann Călin ganz besonders herzlich danke sagen. Ihr seid mir immer eine große Hilfe gewesen, besonders in schwierigen Zeiten hat euer Rat und Beistand mir stets Mut gemacht. Darüber hinaus danke ich dir, Călin, für deine fachliche Hilfe, deine wertvollen Ideen, deine Motivation, sowie deine ständige Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke meiner Tochter Leana, für die treue Begleitung während der letzten Monate meiner Arbeit.

Anhang

Im Anhang sind die HCV-Core_{c-Terminus}-E1/E2 Sequenzen, die als Matritze zur Herstellung der Konsensussequenzen mittels ortsgerichteter Mutagenese verwendet wurden, zusammengefasst. Es wurde jeweils der Klon, welcher der berechneten Konsensussequenz am ähnlichsten war, zur Herstellung der Konsensussequenz verwendet. Bei den Sequenzen, die aus den Seren 85 und 11632 amplifiziert wurden, war keine ortsgerichtete Mutagenese notwendig, da jeweils ein Klon der berechneten Konsensussequenz entsprach. In den folgenden Homologieanalysen sind die Positionen, an denen die Mutagenese-Primer binden, hervorgehoben. Ferner ist die eingeführte Mutation farblich gekennzeichnet.

	10	20	30	40	50	60	70
85-kon						
85-klon5	DLMGYIPLVGAPLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTIPASAYEVRNVSGVY						
.....							
	80	90	100	110	120	130	140
85-kon						
85-klon5	HVTNDCSNTSIVYEAADMILHTPGCVPCVREGNSSRCWVALTPTLAARNASIPTTAIRRHVDLLVGAAAF						
.....							
	150	160	170	180	190	200	210
85-kon						
85-klon5	CSAMYVGDLCGSVFLVSQLFTFSPRRHQTMQDCNCISIYPGHLSGHRMAWDMMNWSPTTAIVVSQLLRIP						
.....							
	220	230	240	250	260	270	280
85-kon						
85-klon5	QAIMDMVAGAHWGVLAGLAYYSMVGNWAKVLIVMLLFAGVDGSTYVTGGSQAYTTTRGLTSLFSLGSQQKV						
.....							
	290	300	310	320	330	340	350
85-kon						
85-klon5	QLVNTNGSWHINRTALNCNDSLQTFGLAALFYTHRFNSSGCPERMASCRPIDFAQGWGPITYDESGGSD						
.....							
	360	370	380	390	400	410	420
85-kon						
85-klon5	QKPYCWHYAPRPCGIVPASQVCGPVYCFTPSPVVVGTTDHLGVPTYNWGENATDVMLLNNTTRPPQGNWFG						
.....							
	430	440	450	460	470	480	490
85-kon						
85-klon5	CTWMNSTGFTKTCGGPPCKIGGVGNNTLVCPTDCFRKHPEATYTKCGSGPWLTTPRCLVDYPYRLWHYPCT						
.....							
	500	510	520	530	540	550	560
85-kon						
85-klon5	VNFTIFKVRMYVGGVEHRLNAACNWTGERCNLEDRDRSELSPLLLSTTEWQVLPSCFTTLPALSTGLIH						
.....							
	570	580	590	600	610		
85-kon						
85-klon5	LHQNIVDVQYLYGIGSVVVGFAIKWEYVLLLFLLLADARVCACLWMMLLIAQAE						
.....							

	10	20	30	40	50	60	70
11632-kon						
11632-Klon1	FADLMGYIPVVGAPVGGVARALAHGVRVLEDGINYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAVEVRNISS						
	80	90	100	110	120	130	140
11632-kon						
11632-Klon1	SYyatNDCSNSSITWQLTNAVLHLPGCVPCENDNGTLHCWIQVTPNVAVKHrgALThNLrTHIDMIvMAA						
	150	160	170	180	190	200	210
11632-kon						
11632-Klon1	TVCSALyVGdVCGAVMIvSQAFIISPERHNFTQECNCSVYQGHITGHRMAWDMMLGWSPTLTmILAYAAr						
	220	230	240	250	260	270	280
11632-kon						
11632-Klon1	VPELVLEVvFGGHWGVVfGLAYfSMQGAwAKVVAILLLVAGVDATHTTTGATmGRAALGFTGLfTSGPQQ						
	290	300	310	320	330	340	350
11632-kon						
11632-Klon1	QISLINTNGSWHINrTALNCNDSLQTFIAALFYTrNFNSSGCPERLSSCRELDDFrIGWGALEYETSVT						
	360	370	380	390	400	410	420
11632-kon						
11632-Klon1	NDEDMRPYCWHyPPRPGIvPARTVCGPVYCFtPSPVVVGtTDKQGVPTYSWGENETDVfLLNSTRPPQg						
	430	440	450	460	470	480	490
11632-kon						
11632-Klon1	AWFGCTWmNGTGfTKTCGAPPCrIRKDHNGTLdLLCPTDCFRKHpgTTYLKCGSGPWLTPrCLVDYPYrL						
	500	510	520	530	540	550	560
11632-kon						
11632-Klon1	WHYPCTVnFTIfKVRMyVGGVEHrFSAACNFTrGDRCrLEDrdRGQsPLlhSTTEwAILPCSFSDLPAL						
	570	580	590	600	610	620	
11632-kon						
11632-Klon1	STGLLHLHqNIvDVQYLYGLSPAIrYLVKWEwVVLLfLLLADARVCACLWMLILlGQAE						

	10	20	30	40	50	60	70
21693-kon						
21693-Klon4	FADLMGYIPVVGAPVGGVARALAHGVRVLEDGINYATGNLPGCSFSIFLLALLSCVTVPVSAVEVRNISS						
	80	90	100	110	120	130	140
21693-kon						
21693-Klon4	SYYATNDCPNKSITWQLTNAVLHLPGCVPCENDNGTLRCWVQVSPNVAVKYRGALHTNLRTHVDMIVMAA						
	150	160	170	180	190	200	210
21693-kon						
21693-Klon4	TVCSALYVGDVCGAVMIASQALIISPERRHNTQECNCISYQGHITGHRMAWDMMLNWSPTLTMVLAYAAR						
	220	230	240	250	260	270	280
21693-kon						
21693-Klon4	VPELVLEVVFGGHWGVVFGLAYFSMQGAWAKVIAILLVAGVDATTYSSGAIAGHTISGFTSLFTLGPQQ						
	290	300	310	320	330	340	350
21693-kon						
21693-Klon4	KLSLINTNGSWHINRTALNCNDTLKTGFIAALFYTKSFNSSGCPERLSSCRGLDDFRIGWGTLEYETNVT						
	360	370	380	390	400	410	420
21693-kon						
21693-Klon4	NDEDMRPYCWHPKPCGIVSARTVCGPVYCFTPSPVVGTTDRQGVPTYSWGENETDVFVLNSTRPPQG						
	430	440	450	460	470	480	490
21693-kon						
21693-Klon4	AWFGCTWMNGTGFTKTCGAPPCRIRRDYNGTLDLLCPTDCFRKHPDPTYLKCGAGPWLTpkCLVDYSYRL						
	500	510	520	530	540	550	560
21693-kon						
21693-Klon4	WHYPCTVNFTIFKVRMYVGGVEHRLSAACNFTRGDRCLDRDRGQQTPLLHSTTEWSVLPCTFSDLPAL						
	570	580	590	600	610	620	
21693-kon						
21693-Klon4	STGLMHLHQNIQVDVQYLYGLSPAITRYIVKWEWVLLFLLLADARVCACLWMLILLGQAE*						

Primer:

	C	F	T	P	S	P	V	V	V	G
21693-4M1	tgt	ttt	act	ccc	agc	cct	gtt	gtc	gtg	ggc

	10	20	30	40	50	60	70
21949-kon						
21949-Klon1	FADLMGYIPLVGAPVGGVARALAHGVRALEDGINFATGNLPGCSFSIFLLALFSCLIHPAASLEWRNTSG						
	80	90	100	110	120	130	140
21949-kon						
21949-Klon1	LYVLTNDCSNSSIVYEADDVILHTPGCVPCVQDGNTSACWTFVTPPTVAVRYVGATTASIRSHVDLLVGAA						
	150	160	170	180	190	200	210
21949-kon						
21949-Klon1	TMCSALYVGDMCGAVFLVGQAFTFRPRRHQTVQTCNCSLYPGHLTGHRMAWDMMMNWSPAVGMVVAHVLR						
	220	230	240	250	260	270	280
21949-kon						
21949-Klon1	LPQTLFDIIAGAHWGIMAGLAYYSMQGNWAKVAIIMVMFSGVDAESHTIGGRIARFTSSFAGMFNRGPQQ						
	290	300	310	320	330	340	350
21949-kon						
21949-Klon1	NLQLVNSNGSWHINSTALNCNESINTGFIAGLIYFHRFNSTGCPQRLSRCKPITYFKQGWGPLTDANISG						
	360	370	380	390	400	410	420
21949-kon						
21949-Klon1	SSDDRPYCWHYAPKPCTVVRAKQVCGPVYCFPTSPVVVGTTDAKGVPTFRWGENESDVFLLES LRPPNGR						
	430	440	450	460	470	480	490
21949-kon						
21949-Klon1	WFGCSWMNSSGFVKTCGAPPCNIYGGGNNISNESDLFCPTDCFRKHPEATYGRGAGPWLTPRCMVDYPY						
	500	510	520	530	540	550	560
21949-kon						
21949-Klon1	RLWHYPCTVNFTLFKVRMFVGGFEHFRFDAACNWTRGERCDIEDRDRSEQQLLHSTTELAILPCSFTPMP						
	570	580	590	600	610	620	
21949-kon						
21949-Klon1	ALSTGLIHLHQNIVDVQYLYGVGSGMVGWALKWEFVILVFLLLADARVCVALWMLMTISQAE*						

Primer:

21949-1-M1	T	S	G	L	Y	V	L	T	N	D	C	S
	ACG	TCT	GGC	CTC	TAC	GTC	CTT	ACC	AAC	GAC	TGT	TCC

21949-1-M2	S	A	C	W	T	P	V	T	P	T	V	
	TCC	GCG	TGT	TGG	ACC	CCA	GTG	ACA	CCT	ACA	GTG	GC

21949-1-M3	T	A	S	I	R	S	H	V	D	L	L	V
	ACC	GCT	TCA	ATA	CGC	AGT	CAT	GTG	GAC	CTA	TTA	GTA GG

21949-1-M4	D	I	I	A	G	A	H	W	G	I	M	A
	GAC	ATA	ATA	GCC	GGG	GCC	CAT	TGG	GGC	ATC	ATG	GCG

21949-1-M5	K	V	R	M	F	V	G	G	F	E	H	R	F	D	
	AAG	GTG	AGG	ATG	TTT	GTG	GGT	GGG	TTT	GAG	CAC	CGG	TTT	GAC	GC

	10	20	30	40	50	60	70
21952-kon						
21952-Klon2	FADLMGYIPLVGAPVGGVARALAHGVRALEDGINFATGNLPGCSFSIFLLALFSLIHPAASLEWRNTSG						
	80	90	100	110	120	130	140
21952-kon						
21952-Klon2	LYVLTNDCSNSSIVYEADDVILHTPGCVPCVQDGNTSTCWTPVTPTVAVRYVGATTASIRSHVDLLVGAA						
	150	160	170	180	190	200	210
21952-kon						
21952-Klon2	TMCSALYVGDMCGAVFLVGQAFTFRPRRHQTVQTCNCSLYPGHLSGHRMAWDMMMNWSPAVGMVVAHVLR						
	220	230	240	250	260	270	280
21952-kon						
21952-Klon2	LPQTLFDIIAGAHWGILAGLAYYSMQGNWAKVAIIMVMFSGVDASTRITGGSAAFDAKGFTSLFSRGAQQ						
	290	300	310	320	330	340	350
21952-kon						
21952-Klon2	KLQLVNTNGSWHINSTALNCNESINTGFIAGLFYYHKFNSTGCPQRLSSCKPITFFNQGWGPLTDANITG						
	360	370	380	390	400	410	420
21952-kon						
21952-Klon2	SSEDKPYCWHYAPRPCENVPASSVCGPVYCFTPSPVVGTTDAKGAPTYNWGANKSDVFLLESLRPPSGR						
	430	440	450	460	470	480	490
21952-kon						
21952-Klon2	WFGCSWMNSTGFTVKTCGAPPCNIYGDGRNSQNESDLFCPTDCFRKHPEATYSRCGAGPWLTPRCMVDYPY						
	500	510	520	530	540	550	560
21952-kon						
21952-Klon2	RLWHYPCTVNFTLFKVRMFVGGFEHRFTAACNWTRGERCDIEDRDRSEQHPLLHSTTELAILPCSFTPMF						
	570	580	590	600	610	620	
21952-kon						
21952-Klon2	ALSTGLIHLHQNIVDVQYLYGVGSGMVGWALKWEFVILVFLLLADARVCVALWMLTISQAE*						
 *LEN						

Primer:

21952-2-M1	V	I	L	H	T	P	G	C	V	P	C	V	C
	GTC	ATT	CTG	CAC	ACG	CCT	GGC	TGT	GTA	CCT	TGT	GTC	C
21952-2-M2	S	P	V	V	V	G	T	T	D	A	K	G	G
	TCG	CCG	GTG	GTC	GTA	GGC	ACT	ACT	GAT	GCT	AAA	GGC	GC
21952-2-M3	S	D	V	F	L	L	E	S	L	R	P	P	
	TCA	GAT	GTG	TTT	CTG	CTG	GAG	TCC	CTG	CGG	CCT	CCC	AG
21952-2-M4	N	S	T	G	F	V	K	T	C	G	A	P	
	AAC	TCC	ACG	GGG	TTT	GTC	AAG	ACG	TGC	GGA	GCT	CCC	
21953-2-M5	Y	G	D	G	R	N	S	Q	N	E	S	D	
	TAT	GGG	GAT	GGG	AGG	AAC	TCC	CAA	AAT	GAG	TCA	GAC	C